



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του HIF-1α που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση του και ανάλυση δεδομένων μετά από φασματοσκοπία μαζών »

**ΔΑΤΣΗ ΕΛΕΝΗ**

Λάρισα, Οκτώβριος 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY**

**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**

**FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

**DIPLOMA THESIS**

**“Investigation of phosphorylation-dependent HIF-1 $\alpha$  protein interactions by analyzing mass spectroscopy data”**

**DATSI ELENI**

Larisa, October 2021

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

**Μυλωνής Ηλίας**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Ιατρικής,  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

**Γιακουντής Αντώνιος**, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γενωμικής,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας κυρίου Μυλωνή Ηλία.

### Ευχαριστίες

Θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Η. Μυλωνή τόσο για την υπόδειξη του ενδιαφέροντος αυτού θέματος και της επιστημονικής του καθοδήγησης όσο και για το ενδιαφέρον του για την επιτυχή ολοκλήρωση των σπουδών μου. Παρά το γεγονός πως ήταν η πρώτη μου επαφή με το εργαστηριακό περιβάλλον, η συνεχής παρουσία του και διάθεση να μου λύσει κάθε απορία έκανε την παραμονή μου στο εργαστήριο ευχάριστη και αρκετά ενδιαφέρουσα.

Οφείλω, επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας και διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, κ. Γ.Σίμο που με δέχτηκε στο εργαστήριο ως προπτυχιακή φοιτήτρια παρά της δύσκολης επικαιρότητας και των περιορισμών. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Αρσένη Χριστίνα για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση. Η φιλική διάθεση και η προθυμία της να μοιραστεί τις γνώσεις της ήταν αυτά που εκτίμησα ιδιαίτερα. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και καθηγητές μου κ. Γιακουντή Αντώνιο Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας που μοιράστηκαν τις γνώσεις τους όλα αυτά τα χρόνια και καθοδήγησαν την πρώτη μου επαφή με την επιστήμη. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια συμβάλλοντας στην επιτυχή διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας και στην ευχάριστη παραμονή μου στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	1
Περίληψη .....	4
ABSTRACT.....	5
<b>1.Εισαγωγή – Υποξία .....</b>	<b>6</b>
1.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	6
1.2 Η δομή των μεταγραφικών παραγόντων HIF .....	7
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α – Δομή και λειτουργία.....	8
1.4 Ο ρόλος του HIF-1α στον καρκίνο .....	10
1.5 Ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α από το οξυγόνο.....	12
1.6 Ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας .....	13
1.6.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	13
1.6.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης.....	14
1.6.3 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες.....	15
1.6.4 Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της υπομονάδας του HIF-1α.....	17
1.6.4.1 Ακετυλίωση (Acetylation).....	18
1.6.4.2 S-νιτροσυλίωση (S-nitrosylation).....	18
1.6.4.3 Σουμουλίωση (Sumoylation).....	18
1.6.4.4 Φωσφορυλίωση (Phosphorylation).....	19
<b>2.Σκοπός εργασίας.....</b>	<b>24</b>
<b>3.Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Βακτηριακά στελέχη .....	25
3.1.2 Κυτταρικές σειρές.....	25
3.1.3 Πλασμδιακοί φορείς .....	25
3.1.4 Χημικά αντιδραστήρια και kit απομόνωσης.....	26
3.1.5 Ένζυμα (Περιοριστικές ενδονουκλεάσες).....	26
3.1.6 Αντισώματα.....	27
<b>3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>27</b>

3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	27
3.2.2 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	28
3.2.3 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς.....	28
3.2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	29
3.2.5 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli Top10 και BL21RIL.....	31
3.2.6 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας μικρής και μεγάλης κλίμακας.....	32
3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές υγρές καλλιέργειες μικρής και μεσαίας κλίμακας.....	32
3.2.8 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων με IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyrasonide).....	34
3.2.9 Καθαρισμός πρωτεΐνης από βακτηριακά κύτταρα.....	34
3.2.10 Προσδιορισμός Bradford.....	36
3.2.11 Ανάλυση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE.....	36
3.2.12 Χρώση των πρωτεϊνών της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue.....	37
3.2.13 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	37
3.2.14 Παρασκευή εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa.....	38
3.2.15 Πρωτόκολλο απομόνωσης μικροσωληνίσκων.....	39
3.2.16 Πειράματα συγκατακρήμνισης ( pulldown assays).....	41
<b>4.Αποτελέσματα.....</b>	<b>42</b>
4.1 Οντολογική βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων φασματοσκοπίας μάζας.....	42
4.2 Πέψη των πλασμιδιακών φορέων pCMV-Flag και pGEX-4T1 με το περιοριστικό ένζυμο BamHI.....	47
4.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για τον έλεγχο των παρασκευαστικών πέψεων.....	49
4.4 Απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος.....	50
4.5 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων με σκοπό τον έλεγχο καθαρισμού.....	50
4.6 Αντίδραση DNA λιγάσης T4 και κλωνοποίηση ενθεμάτων σε φορείς pGEX-4T1.....	51
4.7 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli με πλασμιδιακούς φορείς και δημιουργία αποικιών σε τρυβλίο petri.....	52
4.8 Ανάπτυξη βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας .....	52

4.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης .....	53
4.10 Πέψη και ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA βακτηριακών αποικιών.....	53
4.11 Δημιουργία καθαρού πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες.....	55
4.12 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρές βακτηριακές καλλιέργειες με το “Plasmid Mini kit” .....	55
4.13 Μετασχηματισμός της βακτηριακής σειράς BL21RIL με τις πλασμιδιακές κατασκευές και δημιουργία υγρών καλλιεργειών μικρής κλίμακας .....	57
4.14 Δημιουργία υγρών βακτηριακών καλλιεργειών μεσαίας κλίμακας και επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης με IPTG.....	58
4.15 Απομόνωση – Καθαρισμός πρωτεϊνών.....	58
4.16 Επιβεβαίωση ταυτότητας καθαρισμένων πρωτεϊνικών τμημάτων του HIF-1α.....	60
4.17 Απομόνωση εκχυλισμάτων εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων.....	61
4.18 In vitro δοκιμή συγκατακρήμνισης με τις διαφορετικές μορφές του GST-HIF-1α- 1-347 (Pull-down assays).....	62
5.Συζήτηση.....	64
6. Βιβλιογραφία.....	67

## Περίληψη

Η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου (υποξία) τόσο σε επίπεδο κυττάρων όσο και ιστών χαρακτηρίζει ένα σύνολο φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Οι κύριοι ρυθμιστές της απόκρισης στην υποξία σε επίπεδο μεταγραφής είναι οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες (Hypoxia Inducible Factors, HIFs), οι οποίοι επάγουν την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με διαδικασίες όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση και ο μεταβολισμός.

Το πρώτο μέλος της μικρής οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων HIF που αποτελεί αντικείμενο έντονης ερευνητικής μελέτης είναι ο HIF-1 και συγκεκριμένα η α υπομονάδα του (HIF-1α). Η ρύθμιση της α- υπομονάδας εκτός από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αλλά και σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η συχνότερη μετα-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-1α και καθοριστική για τη δράση του είναι η φωσφορυλίωση.

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ταυτοποιήθηκαν δύο διακριτές φωσφορυλίωσεις του HIF-1α. Η πρώτη αφορά τη φωσφορυλίωση του από την κινάση CK1δ στο κατάλοιπο σερίνης S247 η οποία τον ρυθμίζει αρνητικά καθώς παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό της HIF-1α υπομονάδας με τον ARNT. Η δεύτερη φωσφορυλίωση αφορά τις κινάσες ERK1/2 που τον ρυθμίζουν θετικά φωσφορυλιώνοντας τα κατάλοιπα Ser641 και Ser643. Οι φωσφορυλίωσεις αυτές ωθούν στην πυρηνική συσσώρευση της HIF-1α υπομονάδας καθώς καταργείται το σήμα εξόδου από τον πυρήνα που αναγνωρίζεται από την εξαπορτινή CRM-1. Όπως είναι φανερό αυτές οι φωσφορυλίωσεις έχουν αντίθετους ρόλους. Ένα από τα ερευνητικά ενδιαφέροντα του εργαστηρίου είναι η περαιτέρω διαλεύκανση του ρόλου αυτών των διακριτών φωσφορυλίωσεων στη χωροχρονική ρύθμιση του HIF-1α.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά βιοπληροφορική μελέτη η οποία βασίζεται σε αποτελέσματα φασματοσκοπίας μάζας ανοσοκατακρημνισμένων πρωτεϊνών με το διπλό S247D-S641/3A μετάλλαγμα του HIF-1α. Η ανάλυση έδειξε ότι η συγκεκριμένη μορφή του HIF-1α αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου, των μικροσωληνίσκων και του μονοπατιού της γλυκόλυσης. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια συσχέτισης της φωσφορυλίωσης στη θέση S247 από την CK1δ με την αλληλεπίδραση του HIF-1α με πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων και κυρίως της τουμπουλίνης. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν cDNA του HIF-1α που κωδικοποιούν για τα τμήματα 1-347 αγρίου τύπου, 1-347SA που δεν φωσφορυλιώνεται από την CK1δ και 1-347SD που μιμείται τη φωσφορυλίωση σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης σε βακτήρια. Στην συνέχεια έγινε επαγωγή της έκφρασης τους σε σύντηξη με την GST σε βακτήρια και καθαρισμός με στήλη αγγιστείας. Πείραμα συγκατακρήμνισης με εκχυλίσματα που περιέχουν πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων δείχθηκε ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη και ότι η μίμηση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τη CK1δ στη θέση S247 (SD μετάλλαξη) ενισχύει αυτή την αλληλεπίδραση.



## ABSTRACT

Low oxygen availability (hypoxia) both in tissues and cells is a common trait of physiological and pathological conditions. Hypoxia-inducible factors (HIFs) are the main transcriptional activators of the cellular response to hypoxia as they control the transcription of genes that are involved in processes like angiogenesis, erythropoiesis, and metabolism.

Recently, the most studied isoform of HIF family that is lately subject of intense research is HIF-1 and specifically its HIF-1 $\alpha$  subunit. Its regulation in addition to the availability of oxygen is certainly based on post-transcriptional modifications and protein-protein interactions. The most extensively studied post-translational modification and decisive of its activity is phosphorylation.

Previous studies at the Laboratory of Biochemistry, at the Faculty of Medicine at University of Thessaly have identified two discrete modifications of HIF-1 $\alpha$ . Phosphorylation of HIF-1 $\alpha$  by CK1 $\delta$  kinase in serine S247 has negative effect on its function by inhibiting HIF-1 $\alpha$  heterodimerization with ARNT. The second phosphorylation by ERK1/2 kinases occurs in Ser641 and Ser643 and activate HIF-1. This particular modification promotes HIF-1 $\alpha$  nuclear accumulation and, subsequently, HIF-1 transcriptional activity by impairing HIF-1 $\alpha$  nuclear export by CRM-1. These two distinct phosphorylation events have opposing effects on HIF-1 activity. Thus, one of the research interests of the Laboratory of Biochemistry is to analyze the possible interplay between these two antagonistic phosphorylation events and their functional significance.

In the present study we applied, bioinformatics analysis of mass spectroscopy data that were collected from HIF-1 $\alpha$  immunoprecipitates from cells expressing the HIF-1 $\alpha$  S247D-S641/3A double mutant. Our analysis revealed that this mutant form of HIF-1 $\alpha$  interacts with mitochondrial, microtubule and glycolysis proteins. Following we tried to correlate the HIF-1 $\alpha$  phosphorylation at position S247 by CK1 $\delta$  with interactions occurring at microtubules. To this end, we cloned in bacterial expression vectors the HIF-1 $\alpha$  cDNAs encoding for fragments 1-347 wild type, phosphodeficient 1-347SA and phosphomimetic 1-347SD. These fragments were expressed as GST-tagged proteins in bacteria and purified by affinity resins. *In vitro* pull-down assays from cellular extracts rich in microtubule proteins revealed that HIF-1 $\alpha$  interacts with microtubule proteins such as tubulin. Furthermore, it was shown that interaction with tubulin is enhanced by mimicking the phosphorylation of HIF-1 $\alpha$  by CK1 $\delta$  at the S247 site (SD mutation).

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.Υποξία

Το οξυγόνο αποτελεί απαραίτητο χημικό στοιχείο για την επιβίωση της πλειοψηφίας των ευκαρυωτικών οργανισμών καθώς συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Για το λόγο αυτό η διαθεσιμότητα του είναι σημαντικός καθοριστικός παράγοντας τόσο σε παθολογικές όσο και σε φυσιολογικές καταστάσεις. Φυσιολογικά το οξυγόνο σε μοριακό επίπεδο χρησιμοποιείται για τη παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της αερόβιας αναπνοής καθώς αποτελεί τον τελικό δότη ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια (1).

Εξαιτίας της σημασίας του οξυγόνου σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχουν εξελικτικά διατηρημένοι μοριακοί μηχανισμοί για την αίσθηση και την ανταπόκριση στις αλλαγές συγκέντρωσης οξυγόνου (1). Η μείωση της διαθεσιμότητας οξυγόνου στον οργανισμό είτε σε κυτταρικό επίπεδο είτε σε επίπεδο ιστού ονομάζεται υποξία. Στην υποξία διαταράσσεται η ισορροπία της μεταβολικής δραστηριότητας τους κυττάρου. Μια τέτοια κατάσταση μπορεί να εμφανιστεί σε φυσιολογικές διεργασίες όπως κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, στην εμβρυογένεση και σε υψηλό υψόμετρο αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος ή ακόμα και σε μεταβολικά νοσήματα (2).

Τα κύτταρα αποκρίνονται στις υποξικές συνθήκες μειώνοντας την κατανάλωση οξυγόνου μέσω προσαρμογής του μεταβολισμού τους και ενεργοποίησης των μηχανισμών που προωθούν την ερυθροποίηση και την αγγειογένεση. Αυτό επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό με τον επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης ο οποίος συντονίζεται από τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors - HIFs (2, 3).

#### 1.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι HIF είναι ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούνται από μία οξυγονοεξαρτώμενη  $\alpha$ - υπομονάδα και μια συστατικά εκφραζόμενη  $\beta$ - υπομονάδα, γνωστή και ως ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) η οποία εκφράζεται σταθερά. (4). Οι  $\alpha$ - όσο και η  $\beta$ - υπομονάδα ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων με μοτίβο έλικα -στροφή -έλικα (bHLH) της οικογένειας που περιέχουν το μοτίβο Per-ARNT-Sim (PAS). Το ενεργό ετεροδιμερές προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες DNA (5'-RCGTG-3') είτε στους υποκινητές είτε στους ενισχυτές γονιδίων-στόχων, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE, Hypoxia Response Element) ελέγχοντας την απόκριση του κυττάρου σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (5).

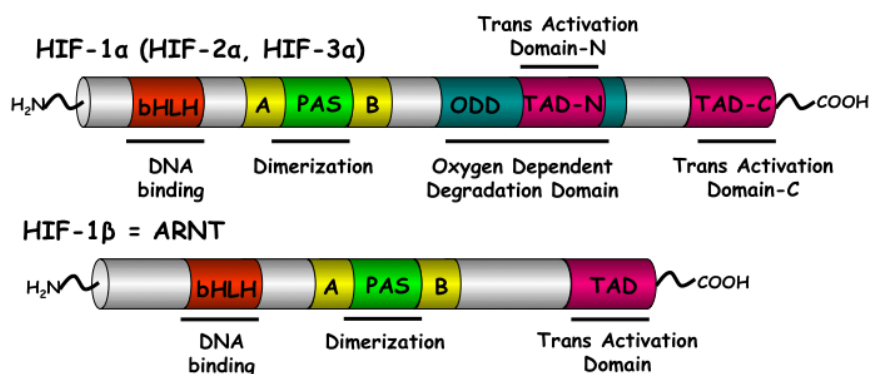
Ως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί 3 ισόμορφες της υπομονάδας  $\alpha$ -: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  και HIF-3 $\alpha$  που κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια *HIF1A*, *EPAS1* και *HIF3A* αντίστοιχα (6).

Η υπομονάδα του HIF-1 $\alpha$  εκφράζεται συστατικά σε όλα τα είδη κυττάρων και ιστών και είναι η πιο καλά μελετημένη σε αντίθεση με την υπομονάδα HIF-2 $\alpha$  που αν και παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τον HIF-1 $\alpha$  η έκφρασή της εμφανίζει ιστο-ειδικότητα και διεγείρει την έκφραση τόσο κοινών με τον HIF-1 όσο και διαφορετικών γονιδίων. Τέλος η υπομονάδα HIF-3 $\alpha$  είναι

η λιγότερο μελετημένη και εμφανίζει τη μικρότερη ομοιότητα με τις άλλες δύο καθώς και διαφορετική λειτουργία με κύριο ρόλο στην αρνητική ρύθμιση του HIF (5).

## 1.2 Η δομή των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF διαθέτει συντηρημένη δομή. Οι τρεις ισομορφές α- καθώς και η β- (**εικόνα 1**) φέρουν μία αμινοτελική επικράτεια με μοτίβο έλικα-θηλιά-έλικα (helix-loop-helix, **bHLH**) που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση στο DNA καθώς και τις επικράτειες **PAS-A** και **PAS-B** που είναι κυρίως υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό της υπομονάδας α- με την β-. Τόσο η επικράτεια PAS όσο και η bHLH εμφανίζουν υψηλή λειτουργική και δομική ομοιότητα μεταξύ των παραγόντων HIF. Οι επικράτειες PAS-A και PAS-B μεταξύ των HIF-1α and HIF-2α εμφανίζουν 70% ομοιότητα ενώ η bHLH εμφανίζει 85% ομοιότητα. Αυτό εξηγεί και την ικανότητα των παραγόντων HIF-1α and HIF-2α να δεσμεύονται σε πανομοιότυπες αλληλουχίες στο DNAs (7). Αντίθετα, οι bHLH and PAS επικράτειες του HIF-3α εμφανίζουν μικρότερη ομοιότητα με αυτές των HIF-1α and HIF-2α εξηγώντας εν μέρει και την διαφορετική του λειτουργία (8).



**Εικόνα 1** Σχηματική αναπαράσταση της δομής της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων HIF – Απεικονίζονται οι δομικές επικράτειες των 2 υπομονάδων .

Επιπλέον, οι HIF-1α και HIF-2α φέρουν στην καρβοξυτελική τους περιοχή δύο διακριτές επικράτειες που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (**N-TAD** και **C-TAD**) αλλά και μία επικράτεια που εξαρτάται από το οξυγόνο (**ODD**) και τις ρυθμίζει βάση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου (9) Πρόκειται για μία αρκετά διατηρημένη επικράτεια η οποία ελέγχει τη δραστηριότητα και τη σταθερότητα των α υπομονάδων, καθώς περιέχει κατάλοιπα προλίνης που υδροξυλιώνονται σε συνθήκες νορμοξίας (5).

Η παρουσία των 2 περιοχών συν-ενεργοποίησης στις διαφορετικές υπομονάδες τους προσδίδει τόσο διακριτές όσο και κοινές ιδιότητες. Η C-TAD προσδέεται σε συν-ενεργοποιητές καθορίζοντας την μεταγραφή γονιδίων που είναι κοινά τόσο για τον HIF-1α όσο και για τον HIF-2α (10). Αντίθετα, η N-TAD περιοχή των HIF-1α και HIF-2α προσδίδει εκλεκτικότητα στην μεταγραφή γονιδίων στόχων μεταξύ αυτών των δύο μελών της οικογένειας εξαιτίας της αναγνώρισης διακριτών μεταγραφικών συμπαραγόντων που διακρίνουν μεταξύ των N-TAD περιοχών του HIF-1α και του HIF-2α (11). Οι περισσότερες

ισομορφές της υπομονάδας HIF-3α φέρουν μια αμινοτελική επικράτεια (N-TAD) αλλά δεν διαθέτουν καρβοξυτελική C-TAD. Αντίθετα φέρουν ένα φερμουάρ λευκίνης άγνωστης λειτουργίας (12). Ρυθμίζουν αρνητικά την HIF-εξαρτώμενη μεταγραφή καθώς ελαττώνουν τη διαθεσιμότητα της HIF-1β υπομονάδας και ανταγωνίζονται τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α (5).

### 1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α – Δομή και λειτουργία

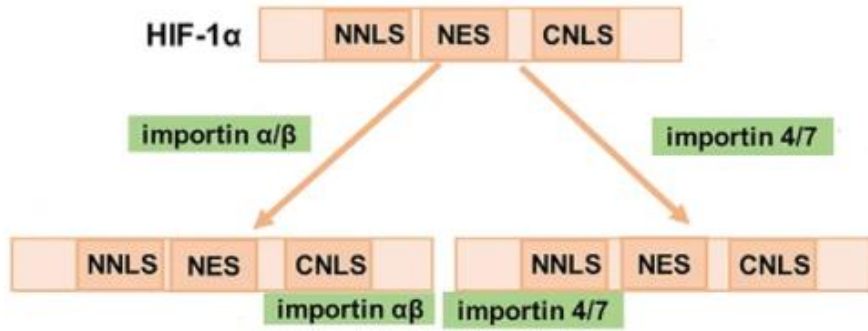
Ο HIF-1α αποτελεί την περισσότερη μελετημένη υπομονάδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF. Στον ανθρώπινο οργανισμό το γονίδιο HIF-1α χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 14q21-q24 και έχει μέγεθος 52.859 ζεύγη βάσεων. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 826 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από 15 εξόνια και το προβλεπόμενο μοριακό της βάρος είναι 92 kDa [Ensembl] (13).

Όπως αναφέρεται παραπάνω (**παράγραφος 1.2**) η δομή του χαρακτηρίζεται από διακριτές επικράτειες. Πιο συγκεκριμένα:

- Επικράτεια **bHLH** (31-71), που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του HIF-1 στις περιοχές HRE του DNA.
- Επικράτεια **PAS** με τις υποπεριοχές ετεροδιμερισμού με τον ARNT **PAS-A** ( 85-158) και **PAS-B** (κατάλοιπα 228-298).
- Επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (**ODD**, Oxygen Dependent Degradation domain), η αλληλεπίδραση της οποίας με άλλες πρωτεΐνες οδηγεί σε αποικοδόμηση του παράγοντα σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου ((14).
- Επικράτειες συν-ενεργοποίησης : **N-TAD** (531-575) και η **C-TAD** ( 786-826).
- Ρυθμιστική επικράτεια **ID** (576-785), η οποία σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου καταστέλλει τη δράση των περιοχών TAD.

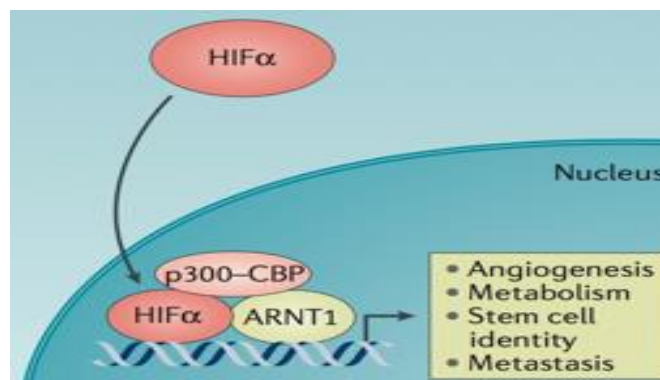
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-1α σχετίζεται άμεσα με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου. Σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου ( νορμοξία) ο HIF-1α είναι μια ασταθής πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής μικρότερο των 10 λεπτών (15).

Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας ο παράγοντας σταθεροποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα, χάρη σε ειδικές αλληλουχίες που περιέχει, οι οποίες ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (**NLS**, Nuclear Localisation Signals). Υπάρχουν δύο περιοχές υπεύθυνες για την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα, μια στην **αμινοτελική** επικράτεια (**NNLS**) που αλληλεπιδρά με τις **μπορτίνες 4/7** και μια στην **καρβοξυτελική περιοχή** (**CNLS**, αμινοξικά κατάλοιπα 718-721) που αλληλεπιδρούν με τις μπορτίνες αβ (**εικόνα 2**) (16). Επιπλέον, ο HIF-1α διαθέτει σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (**NES**, Nuclear Export Signal, κατάλοιπα 631-639) (17).



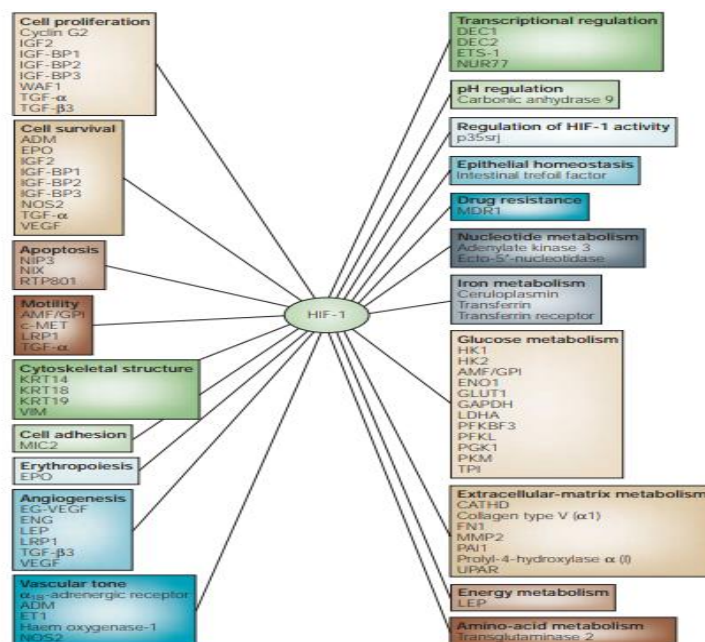
**Εικόνα 2** Απεικόνιση των επικρατειών NLS και NES του HIF-1α και των σημείων πρόσδεσης των ιμφορτινών που θα καθοδηγήσουν την υπομονάδα στον πυρήνα (τροποποιημένη από την αναφορά (18)).

Μετά από την πρόσδεση των ιμφορτινών και τη μεταφορά του στον πυρήνα μέσω πυρηνικών πόρων (NPCs) η εκτεθειμένη αλληλουχία του HIF-1α NES αν το μονοπάτι MAPK/ERK είναι ανενεργό, όπως συμβαίνει σε ένα κύτταρο σε κατάσταση ηρεμίας, η CRM1 θα συνδεθεί με το NES και θα επιστρέψει το HIF-1α στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας έτσι χαμηλή τη πυρηνική του συγκέντρωση και την επακόλουθη χαμηλή δραστηριότητά του. Ωστόσο, αν το μονοπάτι είναι ενεργό (ως απάντηση στην υποξία ή σε άλλα ογκογόνα ερεθίσματα), ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στην επικράτεια NES η οποία πλέον δεν αναγνωρίζεται από τη CRM1, παγιδευόμενος έτσι το HIF-1α μέσα στον πυρήνα, προωθώντας τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT. Το ετεροδιμερές με τη συμμετοχή συν-ενεργοποιητών (p300/CBP) που προσδένονται στο HIF-1 σύμπλοκο προσεγγίζουν τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRES) στις ρυθμιστικές περιοχές πολλών γονιδίων στόχων (**εικόνα 3**) (19). HRE αλληλουχίες (5'-RCGTG-3') συναντώνται στους προαγωγείς ή τους ενισχυτές των γονιδίων στόχων της υποξίας.



**Εικόνα 3** Ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς HIF-1α-ARNT, η αναγνώριση των συν-ενεργοποιητών p300-CBP και η επαγωγή της μεταγραφής (20).

Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της εξισορρόπησης της συγκέντρωσης του οξυγόνου στα κύτταρα και σε κυτταρικές λειτουργίες επιβίωσης. Μια σημαντική κατηγορία γονιδίων που επάγονται από τους HIF είναι γονίδια που ελέγχουν τον **κυτταρικό μεταβολισμό** (γλυκολυτικά έζυμα), ώστε ακόμα και υπό υποξικές συνθήκες να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου όπως είναι το γονίδιο της γαλακτικής αφυδρογονάσης A. Ακόμη πρόκειται για γονίδια και παραγόντων που αυξάνουν την πρόσληψη οξυγόνου, όπως η ερυθροποιητίνη (EPO) η οποία αυξάνει την παραγωγή νέων ερυθροκυττάρων, ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και οι υποδοχείς τους. Επιπλέον γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη κυτταρική επιβίωση, την απόπτωση, την κυτταρική προσκόλληση, την αγγειογένεση και το μεταβολισμό αμινοξέων και λιπιδίων όπως η λιπίνη 1 και η AGPAT2 (21). Στην **εικόνα 4** φαίνονται επιγραμματικά τα γονίδια που επάγονται από το ετεροδιμερές HIF-1α- ARNT (19).



**Εικόνα 4** Γονίδια- στόχοι του HIF-1α. Με την πρόσδεση του ετεροδιμερούς HIF-1α-ARNT σε περιοχές HRE του DNA επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων της υποξίας που επηρεάζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (19).

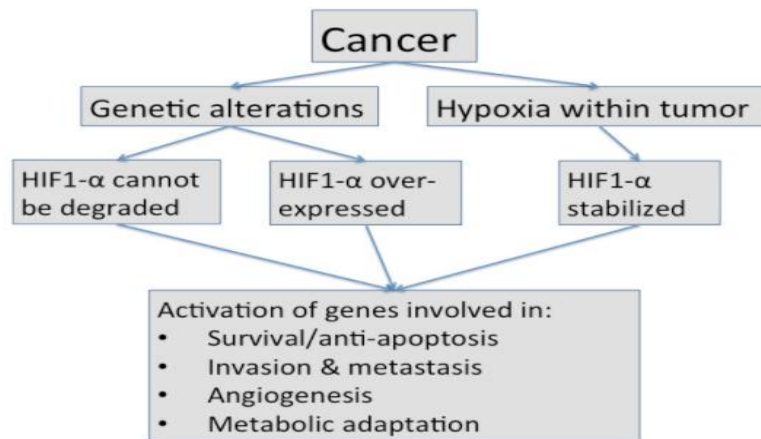
#### 1.4 Ο ρόλος του HIF1α στον καρκίνο

Ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων οδηγεί σε ανεπαρκή παροχή αίματος με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να βρίσκονται συχνά σε υποξικό περιβάλλον. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι ο HIF-1α υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού, στον καρκίνο των ωοθηκών, του οισοφάγου, παχέος εντέρου και του πνεύμονα. Επίσης παρατηρήθηκε πως η έκφραση του HIF-1α ήταν αρκετά υψηλότερη σε πολλαπλούς μεταστατικούς όγκους σε σχέση με τις πρωτογενείς εστίες (22).

Ο HIF-1α εμπλέκεται στη μεταγραφή περισσότερων από 70 γονίδια στόχους σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του όγκου (**εικόνα 5**). Μεταξύ αυτών, υπάρχουν τέσσερις τύποι γονιδίων που σχετίζονται στενά με τον όγκο : γονίδια μεταφοράς της γλυκόζης και της γλυκόλυσης, γονίδια που σχετίζονται με την αγγειογένεση , τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κυττάρων και γονίδια υπεύθυνα για την εισβολή και τη μετάσταση του όγκου. Συνολικά , προάγουν την προσαρμοστικότητα των κυττάρων στο υποξικό περιβάλλον (23). Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-1α επηρεάζει το **μεταβολισμό** αυξάνοντας τους μεταφορείς γλυκόζης ώστε να αυξάνεται η πρόσληψή της , επάγει το γονίδιο του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης A – LDHA η οποία συμβάλλει στην προσαρμογή του κυττάρου στις αναερόβιες συνθήκες (αναερόβια γλυκόλυση) και το γονίδιο κινάσης-1 της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK1) που αναστέλλει την παραγωγή acetyl- CoA και εμποδίζοντας τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος που απαιτεί αποθέματα οξυγόνου. Εκτός από το μοναπάτι της **γλυκόλυσης** και το **κύκλο του Krebs** ο HIF-1α επηρεάζει την **οδό των φωσφορικών πεντοζών** μέσω του οποίου μετατρέπονται τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης σε 5-φωσφοριβόζη, μια σημαντική πρώτη ύλη για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι τα κύτταρα που στερούνται HIF-1α μείωσαν την παραγωγή ATP υπό υποξικές συνθήκες, παράγοντας περισσότερες δραστικές ρίζες χωρίς οξυγόνο προάγοντας την απόπτωση. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το HIF-1α προάγει την επιβίωση των κυττάρων υπό υποξικές συνθήκες ανασυγκροτώντας τις μεταβολικές οδούς των κυττάρων τόσο για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών όσο και για την σύνθεση βιομορίων (RNA,DNA)(23). Επιπρόσθετα ο HIF-1α προωθεί τον **πολλαπλασιασμό** των καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης παραγόντων. Για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή παραγόντων όπως ο ισουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-2 (IGF-2) και του παράγοντα ανάπτυξης όγκου-2 (TGF-2). Αυτοί οι παράγοντες ενεργοποιούν τις οδούς MAPK και PI3K μέσω αναγνώρισης ειδικών υποδοχέων. Μέσω αυτών των οδών οι αυξάνεται περεταίρω η δραστηριότητα του HIF-1α (23).

Όσον αφορά την **απόπτωση** των καρκινικών κυττάρων, ο μηχανισμός είναι πιο πολύπλοκος και τα αποτελέσματα διφορούμενα. Σε αρκετές μελέτες ο HIF-1α σταθεροποιεί την p53 εμποδίζοντας τη μετατόπιση της έξω από τον πυρήνα και κατά συνέπεια την ουβικιτίνωσή της, επάγοντας έτσι διάφορα αποπτωτικά γονίδια ενώ σε άλλες μελέτες, ο HIF-1α είχε επίσης αντι-αποπτωτική δράση.

Τέλος, ο HIF-1α μπορεί να ενισχύσει τη μετάσταση του όγκου, μέσω επαγωγής των μέταλλο-πρωτεΐνικών μήτρας (MMPs) και μείωσης της επιθηλιακής καντερίνης και β-κατενίνης με αποτέλεσμα να μειώνει την πρόσφυση μεταξύ κυττάρων και μήτρας με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό διαχωρισμό και μετανάστευση.



**Εικόνα 5** Κυτταρικές λειτουργίες που προάγουν την καρκινογένεση και την μετάσταση οι οποίες ρυθμίζονται από γονίδια - στόχους του HIF-1α. Η υπερέκφραση της υπομονάδας HIF-1α λόγω του υποξικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου είτε μέσω γενετικών αλλαγών καθορίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (24).

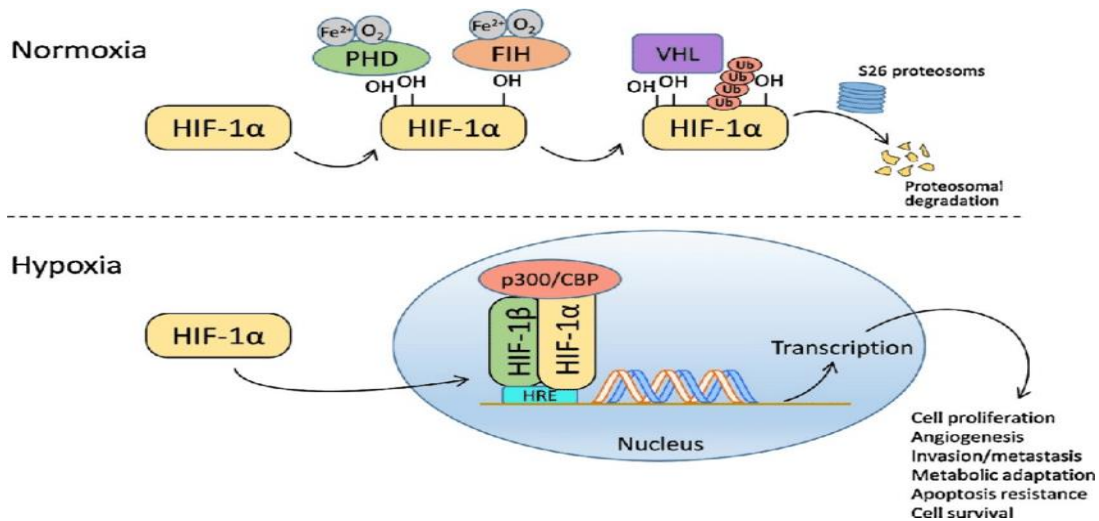
### 1.5 Ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α από το οξυγόνο

Υπό συνθήκες νορμοξίας, οι α- υπομονάδες συνεχώς παράγονται και αποικοδομούνται μέσω υδροξυλίωσης σε 2 κατάλοιπα προλίνης (συγκεκριμένα, στον ανθρώπινο HIF-1α, στα κατάλοιπα 402 και 564) στην οξυγονοεξαρτώμενη επικράτεια αποικοδόμησης (ODDD-oxygen dependent degradation domain). Αυτή η τροποποίηση καταλύεται από 3 προπυλο-υδροξυλάσες (PHDS), οι οποίες είναι ένζυμα των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου αλλά και  $Fe^{2+}$ . Η υδροξυλίωση λειτουργεί ως σήμα για την αναγνώριση από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von-Hippel-Lindau (VHL), μία E3 λιγάση της ουβικιτίνης με αποτέλεσμα την προσθήκη ουράς ουβικιτινών και την επακόλουθη αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Επιπλέον ακετυλίωση του HIF-1α στο κατάλοιπο λυσίνης 532 από την ακέτυλο-τρανσφεράση ARD1 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την αλληλεπίδρασή του με τον VHL, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ουβικιτινίωση και την αποδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα. Ο ρόλος της ακετυλίωσης, ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως (25). Επίσης οξυγονοεξαρτώμενο ένζυμο είναι και η υδροξυλάση του ασπαραγινικού FIH1 (Factor inhibiting HIF 1) η οποία τροποποιεί τις α- υπομονάδες στο καρβοξυτελικό άκρο και συγκεκριμένα στην επικράτεια συνενεργοποίησης C-TAD παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της C-TAD με τους συνενεργοποιητές p300/CBP αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα. Έχει βρεθεί, επίσης, ότι σε συνθήκες ήπιας υποξίας στα μιτοχόνδρια παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), οι οποίες οξειδώνουν τον  $Fe^{2+}$  σε  $Fe^{3+}$ , αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των PHDs και συμβάλλοντας έτσι στην σταθεροποίηση του HIF-1α (26).

Αντίθετα σε καταστάσεις περιορισμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου (υποξία) η απουσία υδροξυλίωσης σταθεροποιεί τον HIF-α ο οποίος διμερίζεται με τον ARNT (HIF-1β) και ακολούθως δημιουργείται σύμπλοκο με τους συν-ενεργοποιητές CBP/p300, το οποίο προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRES), επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων.



Η δύο καταστάσεις (υποξία-νορμοξία) και η ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α απεικονίζονται στην **εικόνα 6**.



**Εικόνα 6 Η ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας.** Σε συνθήκες νορμοξίας η υπομονάδα HIF-1α υδροξυλιώνεται από τις υδροξυλάσες PHDs για τη δράση των οποίων είναι απαραίτητη η παρουσία  $Fe^{2+}$  και  $O_2$ . Η υδροξυλίωση ενισχύει τη σύνδεση της πρωτεΐνης VHL η οποία προσθέτει αλυσίδα ουβικουιτινών που ωθούν τον HIF-1α προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Παράλληλα η υδροξυλίωση από την υδροξυλάση FIH1 παρεμποδίζει τη σύνδεση του ετεροδιμερούς με τους συν-ενεργοποιητές p300/CBP, οδηγώντας σε μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα. Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας η υπομονάδα HIF-1α μετατοπίζεται στον πυρήνα ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων (66).

## 1.6 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας.

Επιπρόσθετα της διαθεσιμότητας οξυγόνου η έκφραση και η δραστηριότητα του HIF-1α ελέγχεται από ανεξάρτητους του οξυγόνου μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων μεταγραφής και μετάφρασης του mRNA του, τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες αλλά και διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (27).

### 1.6.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Αυξημένα επίπεδα ROS φαίνεται να ενισχύουν τη μεταγραφή του HIF-1α μέσω ενίσχυσης της δραστηριότητας του υποκινητή του γονιδίου που τον κωδικοποιεί. Επιπλέον η μεταγραφή του γονιδίου του ρυθμίζεται από δύο κυρίως μεταγραφικούς παράγοντες τον NFκB και τον STAT3. Σε πειράματα υπερέκφρασης του NFκB ή επαγωγής του μετά από φλεγμονή παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του mRNA του και ενίσχυση της δραστηριότητας του υποκινητή του γονιδίου του (28). Επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3 ενεργοποιεί την παραγωγή mRNA του HIF-1α και η δράση του STAT3 επηρεάζεται από την PKR κινάση (29).

### 1.6.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

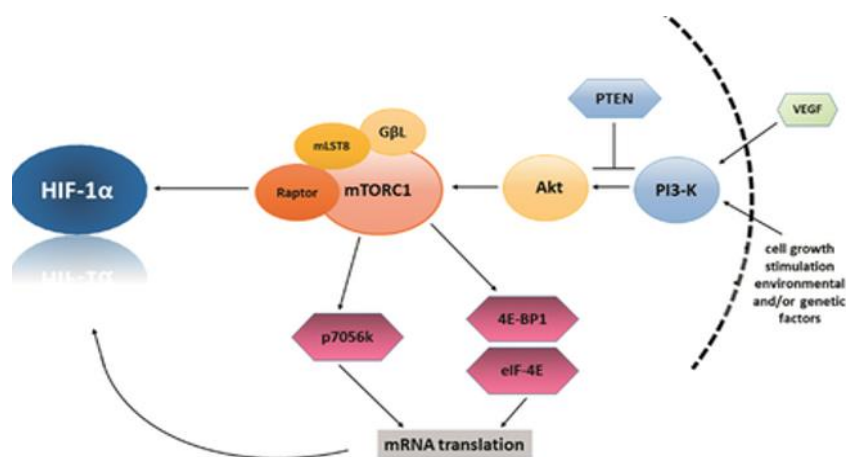
Η πρωτεϊνοσύνθεση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α γίνεται τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας επάγοντας κάθε φορά διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Σε συνθήκες **νορμοξίας** 2 βασικά μονοπάτια ενεργοποιούνται μέσω αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών :

- Μονοπάτι της κινάσης της τριφωσφορικής ινσιτόλης PI3K/Akt/mTOR.
- Μονοπάτι των MAPK κινασών (mitogen-activated protein kinase) (30).

#### Μονοπάτι της κινάσης της τριφωσφορικής ινσιτόλης PI3K/Akt/mTOR

Η **PI3K** (Phosphoinositide 3-kinase) ενεργοποιείται από εξωτερικά αυξητικά σήματα μέσω υποδοχέα τύπου κινάσης τυροσίνης και με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την πρωτεϊνική κινάση B ή **Akt**, η οποία ακολούθως φωσφορυλιώνει την κινάση **mTOR** (mammalian target of rapamycin). Η mTOR φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη **4E-BP1** που προσδένεται στον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (**eIF-4E**) παρεμποδίζοντας, έτσι την αναστολή του παράγοντα έναρξης Έτσι αναγνωρίζεται η 5' καλύπτρας του mRNA του HIF-1α και ξεκινά η μετάφρασή του (**εικόνα 7**).

Επίσης στόχος της mTOR είναι η κινάση του ευκαρυωτικού παράγοντα επιμήκυνσης 2 (**EEF2K**) αλλά και η **p70 S6** κινάση (S6K), η οποία φωσφορυλιώνει την **S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη** (**εικόνα**) με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ικανότητα επιμήκυνσης του mRNA του HIF-1α και έτσι να επάγεται η μετάφραση (31). Πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας έδειξαν ότι το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι επηρεάζεται σημαντικά από την ενεργή μορφή της βιταμίνης D (καλσιτριόλη) η οποία αναστέλλει τη σύνθεση και των δύο HIF-α υπομονάδων (32).



**Εικόνα 7** Σηματοδοτικό μονοπάτι **PI3K/Akt/mTOR** (τροποποιημένη από (33)).

Τέλος, υπάρχουν 2 ακόμα πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR Η πρωτεΐνη **PTEN** που όπως φαίνεται από το σχήμα καταστέλλει την κινάση PI3K, ρυθμίζοντας έτσι αρνητικά την μετάφραση του HIF-1α και η πρωτεΐνη **TSC2** η οποία καταστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης από την Akt.

Συνοψίζοντας, με την ενεργοποίηση το μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR ή μέσω της αναστολής της πρωτεΐνης TSC2 ο ρυθμός σύνθεσης της πρωτεΐνης του HIF-1α αυξάνεται (34).

### **Μονοπάτι των MAPK κινασών**

Επίσης, ο παράγοντας επιμήκησης 4E-BP1 και η κινάση S6K ενεργοποιούνται μέσω του μονοπατιού **RAS->RAF->MEK->ERK** (22). Η ERK στη συνέχεια ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης μια άλλη κινάση του μονοπατιού MAPK κινασών η οποία φωσφορυλιώνει τον eIF-4E, ενεργοποιώντας τη μετάφραση του mRNA του HIF-1α.

Αντίθετα σε συνθήκες **υποξίας**, αν και γενικά τα κύτταρα αποκρίνονται μειώνοντας τον ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης ο HIF-1α συνεχίζει να μεταγράφεται καθώς συμβάλλει στην προσαρμογή των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες. Οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητοί αν και έχει αναφερθεί η ύπαρξη στοιχείου IRES (Internal Ribosome Entry Site) στο mRNA του HIF-1α (35).

### **1.6.3 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες**

Η ρύθμιση τόσο της σταθερότητας όσο και της δράσης του HIF-1α στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή του με ποικιλία πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα μερικές από τις αλληλεπιδράσεις αναφέρονται παρακάτω :

Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη μοριακό συνοδό HSP90 έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίησή του ενώ η σύνδεση με την πρωτεΐνη RACK1 έχει το αντίθετο αποτέλεσμα.

- **HSP90/RACK1**

Η σταθερότητα του HIF-1α ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη-μοριακό συνοδό HSP90 (πρωτεΐνη θερμικού σοκ), με αναστολή της οποίας προκαλείται η αποικοδόμηση του HIF-1α ανεξάρτητη του οξυγόνου (36). Η επικράτεια PAS-A προσδένει τόσο τον υποδοχέα της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης C (RACK1- Receptor of activated protein C kinase) όσο και τη Hsp90. Η πρόσδεση του RACK1 σταθεροποιείται από την πρωτεΐνη SSAT1 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προσελκύεται διαφορετικό από το VHL σύμπλοκο E3 λιγάσης που ωθεί τον HIF-1α προς αποικοδόμηση (37). Συμπερασματικά, η RACK1-SSAT1 ανταγωνίζεται τη HSP90 για πρόσδεση στην επικράτεια PAS-A προάγοντας την αποικοδόμηση του HIF-1α ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου(37). Τέλος, η έκφραση της RACK1 επηρεάζει τη δράση των αναστολέων της HSP90 άρα και την αποικοδόμηση του HIF-1α.

- **p53**

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 και συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και τον έλεγχο απόπτωσης των κυττάρων. Σε συνθήκες υποξίας, αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στην επικράτεια

ODD με αποτέλεσμα να προσελκύεται το σύμπλοκο E3 λιγάνης της ουβικιτίνης, Mdm2 και να οδηγείται ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α στο πρωτεάσωμα. Τα καρκινικά κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας p53, ο HIF-1α έχει αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα (38).

- **CBP/p300**

Η επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής του HIF-1α του καρβοξυτελικού του άκρου C-TAD αλληλεπιδρά με την επικράτεια **CH1** των μεταγραφικών συνενεργοποιητών CBP/p300 και αλλάζει διαμόρφωση με συνέπεια να σχηματίζεται η μεταγραφική μηχανή. Η αλληλεπίδραση αυτή παρεμποδίζεται από την υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης από τον παράγοντα FIH-1 (39).

- **MgRacGap (Male germ cell GTPase activator protein)**

Γενικά η πρωτεΐνη MgRacGap (Male germ cell Rac GTPase activator protein) ρυθμίζει τη δράση των μικρών G- πρωτεϊνών (πρωτεΐνες Rho) που εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Η MgRacGap αλληλεπιδρά ειδικά με τον HIF-1α στην PAS-B επικράτεια (244-352). Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α επηρεάζοντας την αλληλεπίδρασή του με τον ARNT. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-1α δεν επηρεάζονται (40).

- **Myc**

Ο Myc είναι μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιογένεση των μιτοχονδρίων. Ο Myc αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στα αμινοξικά κατάλοιπα (1-329) οδηγώντας σε αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας (41).

- **PSMA7**

Η PSMA7 είναι μία από τις 17 υπομονάδες του πρωτεασώματος 20 S και αλληλεπιδρά με την ανασταλτική επικράτεια του HIF-1α (726-785) με αποτέλεσμα ο HIF-1α να αποικοδομείται (42).

- **Μορταλίνη (GRP75)**

Όπως αναφέρεται στην **παράγραφο 1.6.4.4** όταν ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες ERK1/2 εντοπίζεται στον πυρήνα λόγω απόκρυψης ενός σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα (εξαρτώμενο από τη CRM-1). Έτσι, ετεροδιμερίζεται και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας γονίδια-στόχους της υποξίας. Αντίθετα, όταν καταργείται η φωσφορυλίωση, ο HIF-1α εξέρχεται του πυρήνα μέσω της CRM-1. Πειράματα αναστολής της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 οδήγησαν σε κυτταροπλασματική μετατόπιση του HIF-1α όπου αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη μορταλίνη μέσω μιας εξαρτώμενης από τις ERK περιοχής (ETD, αμινοξέα 616-658) που εδράζεται στην ανασταλτική του επικράτεια (ID). Η μορταλίνη ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνών μοριακών συνοδών HSP70 και συμβάλλει με ποικίλους τρόπους στις κυτταρικές λειτουργίες. Μερικές από τις βασικότερες των οποίων είναι η βιογένεση των μιτοχονδρίων, η αναδίπλωση μη πτυχωμένων (unfolded) και λανθασμένα πτυχωμένων πρωτεϊνών καθώς και η ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης, ανάπτυξης και γήρανσης. Επίσης σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει στην εξέλιξη ορισμένων τύπων καρκίνου που δρα άλλοτε προστατευτικά αναστέλλοντας την απόπτωση και άλλοτε αυξάνοντας την κακοήθεια μέσω υπερέκφρασης της. Η

αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη μορταλίνη καθοδηγεί τον HIF-1α στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά με 2 ακόμα πρωτεΐνες, την εξοκινάση II (HK2), και την πρωτεολυμένη μορφή του διάυλου ανιόντων VDAC1 όπου λείπει το καρβοξυτελικό άκρο (VDAC1-ΔC) οδηγώντας σε αναστολή της απόπτωσης με έναν μην γενωμικό και μη μεταγραφικό τρόπο(43).

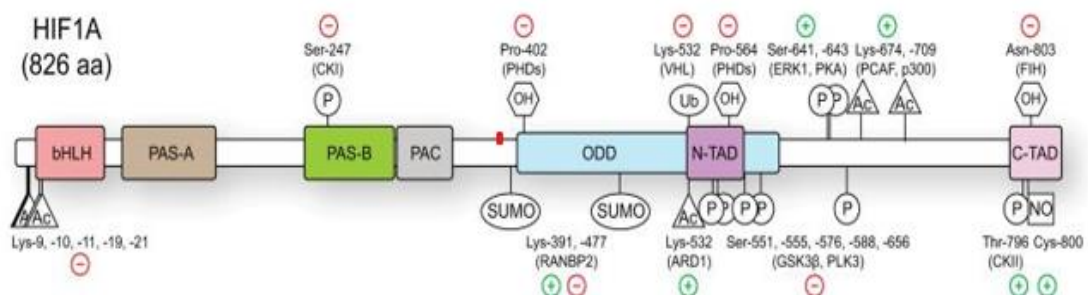
- **Νουκλεοφωσμίνη (NPM1)**

Η νουκλεοφωσμίνη (NPM1) είναι μία πρωτεΐνη του πυρηνίσκου που εντοπίζεται και στο πυρηνόπλασμα, η οποία αλληλεπιδρά με τον φωσφορυλιωμένο από τις ERK1/2 HIF-1α. Ειδικότερα, η φωσφορυλίωση του HIF-1α καθοδηγεί την αλληλεπίδραση με την καρβοξυτελική περιοχή της NPM1 με τελικό αποτέλεσμα να αυξάνεται η μεταγραφική δραστηριότητα του ετεροδιμερούς συμπλόκου HIF-1α/ARNT. Μελέτες απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση του HIF-1 με την NPM1 επιτρέπει τη δημιουργία μιας σταθερής σύνδεσης με τους προαγωγείς γονιδίων που φέρουν στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs), καθιστώντας τη NPM1 συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. Έτσι μελλοντικά, η στόχευση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α/NPM1 σε υποξικούς όγκους μπορεί να αποτελέσει τη βάση μιας νέας αντικαρκινικής στρατηγικής (44).

#### 1.6.4 Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της υπομονάδας HIF-1α.

Η σταθερότητα και η δραστηριότητα της υπομονάδας HIF-1α ρυθμίζεται από τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ( **εικόνα 8** )σε αντίθεση με την β υπομονάδα (ARNT) που εκφράζεται ιδιосύστατα.

Μετά την μετάφραση εκτός από την υδροξυλίωση ο HIF-1α υπόκειται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η σουμουλίωση, η ακετυλίωση, η S-νιτροσυλίωση αν και τα αποτελέσματα αυτών των τροποποιήσεων δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά. Περισσότερο μελετημένη είναι η φωσφορυλίωση.



**Εικόνα 8** Δομικές επικράτειες και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α . Ο HIF-1α αποτελείται από περιοχές που σχετίζονται με την πρόσδεσή του στο DNA (basic Helix-Loop-Helix, bHLH), με περιοχές υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και τις πρωτεϊνικές του αλληλεπιδράσεις (PER-ARNT-SIM, PAS-A, PAS-B) και από την οξυγονοεξαρτώμενη περιοχή αποδόμησης (ODDD) καθώς και την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης ( N-TAD, C-TAD). Εδώ απεικονίζονται ορισμένες από τις τροποποιήσεις καθώς

και τα ένζυμα είναι υπεύθυνα για καθεμία και την επίδρασή τους στην ενεργότητα του HIF-1α, θετική (+) ή αρνητική (-) (5).

#### 1.6.4.1 Ακετυλίωση

Η καλύτερα μελετημένη περίπτωση ακετυλίωσης του HIF-1α είναι σε ένα κατάλοιπο λυσίνης 532 στην περιοχή ODD από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (ARest-Defective 1 protein) που πραγματοποιείται σε συνθήκες νορμοξίας. Η ακετυλίωση αυτή ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση του παράγοντα και αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας παρατηρείται υποακετυλίωση από την ARD1 (45).

#### 1.6.4.2 S-νιτροσουλίσωση (S-nitrosylation)

Η S-νιτροσουλίσωση περιλαμβάνει την προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε σουλφυδρυλικές ομάδες (46). Η S-νιτροσουλίσωση του καταλοίπου κυστεΐνης 800 σχετίζεται με την αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης ωστόσο είναι μια από τις λιγότερο μελετημένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (47).

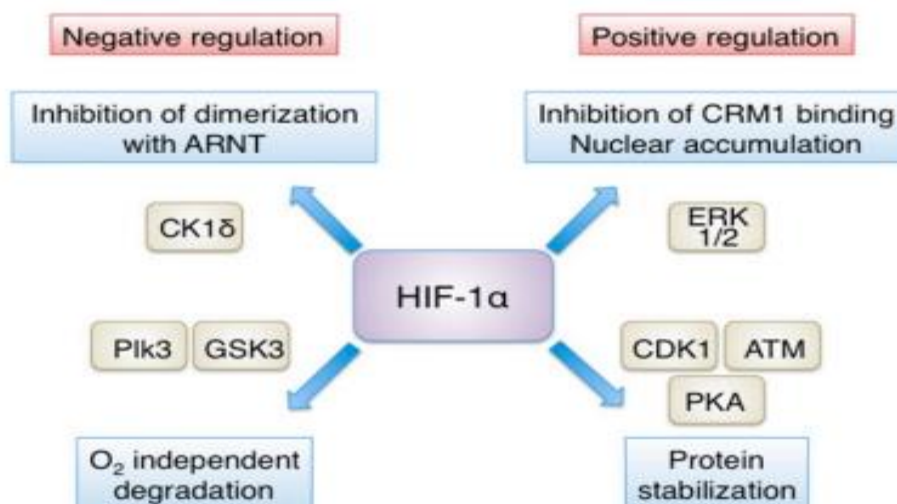
#### 1.6.4.3 Σουμουλίωση (Sumoylation)

Σουμουλίωση των καταλοίπων λυσίνης-391, -477 από την RanBP που αποτελεί μέρος του συμπλόκου E3 λιγάσης – ουβικιτίνης, έχει επιβεβαιωθεί, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτή η τροποποίηση επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την ενεργότητα του HIF-1α (48).

#### 1.6.4.4 Φωσφορυλίωση ( Phosphorylation)

Η φωσφορυλίωση είναι μια αρκετά κοινή και καλά μελετημένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας πιο συχνά σε ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser), θρεονίνης (Thr) ή τυροσίνης (Tyr) της πρωτεΐνης στόχου. Οι μηχανισμοί φωσφορυλίωσης της υπομονάδας HIF-1α ποικίλλουν και είναι κυτταροειδικοί. Η έκταση που φωσφορυλιώνεται ο HIF-1α μπορεί να ποικίλλει ανάλογα το σηματοδοτικό μονοπάτι, τον τύπο κυττάρου ή ακόμα και τον ιστό τα οποία καθορίζουν και τον τύπο κινασών που θα ενεργοποιηθεί. Η φωσφορυλίωση μπορεί να ρυθμίσει τη **σταθερότητα**, την **ενεργότητα**, τον **υποκυτταρικό εντοπισμό** αλλά και τις **αλληλεπιδράσεις** του HIF-1α με άλλες **πρωτεΐνες**. Οι περισσότερες φωσφορυλιώσεις είναι ανεξάρτητες από την διαθεσιμότητα του οξυγόνου (27).

Η φωσφορυλίωση μπορεί να ρυθμίζει είτε θετικά είτε αρνητικά τον HIF-1α (**εικόνα 9**). Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται συνοπτικά οι κινάσες που ρυθμίζουν θετικά και σε αυτές περιλαμβάνονται η ERK1/2 η οποία παρεμποδίζει την πρόσδεση της CRM1 και αυξάνει τον πυρηνικό εντοπισμό του ετεροδιμερούς, η CDK1, ATM και PKA οι οποίες αυξάνουν την σταθερότητα της υπομονάδας HIF-1α. Αντίθετα στις κινάσες που ρυθμίζουν αρνητικά τον HIF-1α περιλαμβάνεται η CK1δ που εμποδίζει τον διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και η Plk3 και GSK3 που οδηγούν την υπομονάδα HIF-1α σε αποικοδόμηση ανεξάρτητη του οξυγόνου (2).



**Εικόνα 9** Διαγραμματική παρουσίαση της θετικής και αρνητικής ρύθμισης του HIF- 1α από την φωσφορυλίωση (2).

Πιο συγκεκριμένα ακολουθούν οι σημαντικότερες φωσφορυλιώσεις του HIF-1α και οι επιδράσεις τους:

- Φωσφορυλίωση του καταλοίπου θρεονίνης (Thr-796) της καρβοξυτελικής περιοχής του HIF-1α από την κινάση της καζεΐνης **CK2** παρατηρείται σε περιπτώσεις ήπιας υποξίας και επηρεάζει αρνητικά την αλληλεπίδρασή του με την υδροξυλάση FIH-1 επηρεάζοντας θετικά την στρατολόγηση των παραγόντων CBP/P300, ενώ, παράλληλα υδροξυλιώνει τον VHL απενεργοποιώντας τον. (49).
- Φωσφορυλίωση από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (**GSK3**) γίνεται σε καταστάσεις παρατεταμένης υποξίας σε 3 κατάλοιπα σερίνης (Ser551,555,589) της αμινοτελικής επικράτειας συν-ενεργοποίησης (N-TAD) προκαλώντας την αποικοδόμηση του. Ειδικότερα, στρατολογούνται πρωτεΐνες (Fbw7 ,US28) που οδηγούν σε ουβικιτινίωση ανεξάρτητη της δράσης της VHL και μεταφορά στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Παρόμοιο αποτέλεσμα προκύπτει και από τη φωσφορυλίωση από την **PIK3** ( Polo like kinase 3) σε 2 κατάλοιπα σερίνης (Ser576, 657(50)).

Αντίθετα, φωσφορυλιώσεις από τις κινάσες **ATM (Ser696),CDK1(Ser668) και PKA** σταθεροποιούν την υπομονάδα HIF-1α αναστέλλοντας την αποικοδόμηση της(2).

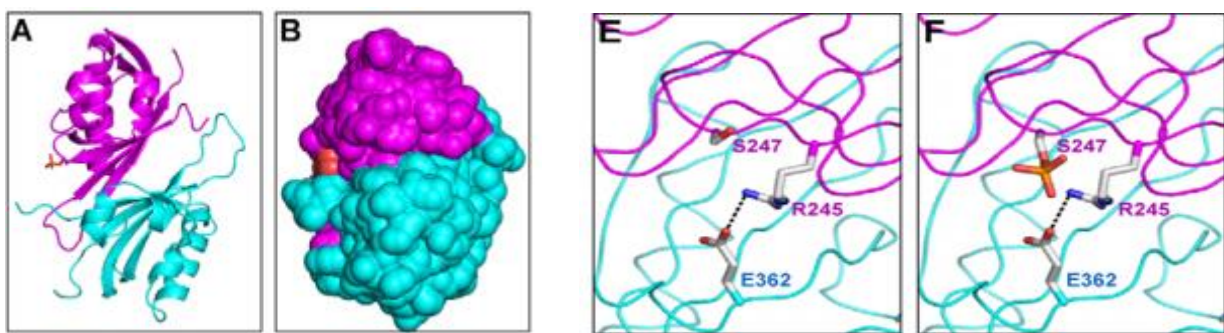
Πολύ σημαντικές φωσφορυλιώσεις που επηρεάζουν την λειτουργικότητα της HIF-1α υπομονάδας και έχουν ανακαλυφθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι οι φωσφορυλιώσεις που διαμεσολαβούνται από την κινάση της καζεΐνης **CK1δ και τις ERK1/2** (51).

## Φωσφορυλίωση από την κινάση της καζεΐνης CK1δ

Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια των κινασών πρωτεϊνών **CK1** ανήκει στην υπερικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης και εμφανίζει μεγάλη ομοιογένεια μεταξύ ευκαρυωτικών οργανισμών. Αποτελείται από τουλάχιστον επτά ισομορφές (α, β, γ1, γ2, γ3, δ και ε) και τα εναλλακτικά μετάγραφα αυτών. Οι κινάσες CK1 φωσφορυλιώνουν πολλά υποστρώματα που σχετίζονται με λειτουργίες τους κυττάρου όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και επικοινωνία, η κυτταρική απόπτωση και πολλαπλασιασμός αλλά και τους κερκάρδιους ρυθμούς. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση κάποιων ισομορφών της οικογένειας κινασών πρωτεϊνών CK1 όπως η CK1δ και αλλαγή στις λειτουργίες τους (52).

Μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έδειξαν πως η ισομορφή CK1δ είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του HIF-1α στο κατάλοιπο σερίνης 247 της επικράτειας PAS-B. Η επικράτεια PAS-B, στην οποία βρίσκεται η θέση φωσφορυλίωσης, είναι η μία από τις δύο επικράτειες του HIF-1α που συμβάλλουν στο σχηματισμό του ετεροδιμερούς HIF-1. Διαπιστώθηκε πως μεταλλάξεις όπου καταργήθηκε η θέση φωσφορυλίωσης (S->A) δεν επηρεάζουν την πυρηνική συσσώρευση ή τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α, ωστόσο φαίνεται να επηρεάζεται ο ετεροδιμερισμός της υπομονάδας του HIF-1α με τον ARNT. Αντίθετα στην περίπτωση της φωσφομιμητικής μετάλλαξης (S->D) αναστέλλεται ο ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον ARNT, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφική δράση του ετεροδιμερούς χωρίς παρόλα αυτά να αλλάζει ο πυρηνικός της εντοπισμός (**Εικόνα 10**) (53). Έτσι η CK1δ έχει άμεσο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου μέσω ρύθμισης της υπομονάδας του HIF-1α επηρεάζοντας έτσι την έκφραση του ενζύμου **λιπίνης-1**. Πιο συγκεκριμένα:

- Σε επόμενες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η αναστολή του HIF-1α μέσω της φωσφορυλίωσής του από τη CK1δ αναστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου της **λιπίνης-1** που αποτελεί γονίδιο στόχο του μεταγραφικού παράγοντα. Έτσι σε υποξικές συνθήκες απουσία της λιπίνης-1 τα καρκινικά κύτταρα δεν σχηματίζουν λιποσταγονίδια στα οποία αποθηκεύονται τα λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο εξαιτίας συσσώρευσης λιπαρών οξέων. (54). Επιπλέον η διακυλογλυκερόλη (DAG) που αποτελεί προϊόν της λιπίνης-1 είναι σηματοδοτικό μόριο σε πολλά μονοπάτια όπως το μονοπάτι mTOR το οποίο σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (54).





**Εικόνα 10** Μοντέλο της δομής της PAS-B περιοχής του ετεροδιμερούς HIF-1α/ARNT και η φωσφορυλίωση από τη CK1δ στη θέση Ser247. **A)** Σχηματική αναπαράσταση τύπου κορδέλας της PAS-B επικράτειας του HIF-1α που συμβολίζεται με μοβ χρώμα και του ARNT που συμβολίζεται με μπλε. Η θέση της σερίνης (Ser247) αναπαρίσταται με πορτοκαλί. **B)** Χωροπληρωτικό μοντέλο των PAS-B επικρατειών HIF-1α/ARNT που αλληλεπιδρούν. **E)** Αναπαράσταση της δημιουργίας ετεροδιμερούς μέσω των αμινοξικών καταλοίπων Arg245 του HIF-1α και του Glu362 του ARNT όπου δημιουργείται μια γέφυρα άλατος η οποία σταθεροποιεί το ετεροδιμερές. Η πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου Ser247 του HIF-1α συμμετέχει επίσης. **F)** Η Ser247 φωσφορυλιώνεται και αποτρέπεται η δημιουργία δεσμού μεταξύ των παραπάνω καταλοίπων του HIF-1α και του ARNT (54).

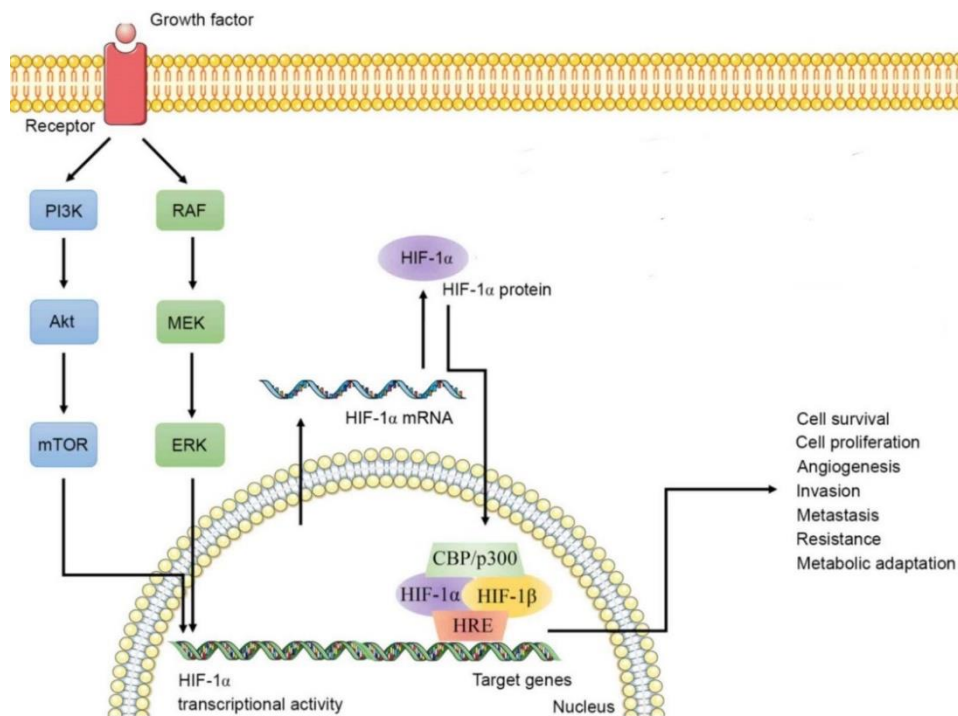
### **Φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2**

Τέλος, μια πολύ σημαντική φωσφορυλίωση για την μεταγραφική ενεργότητα του HIF- 1α καθώς καθορίζει την συσσώρευση του στον πυρήνα αλλά και την ενεργότητα του είναι των καταλοίπων σερίνης (S641, S643) από την **ERK1/2** (p42/44 MAPK) στην επικράτεια ID όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK) συνδέει εξωκυττάρια σήματα, όπως παράγοντες αύξησης, κυτοκίνες αλλά και την υποξία με τον έλεγχο σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση. Κατά την ενεργοποίηση του πραγματοποιούνται 3 διαδοχικές φωσφορυλίωσεις (καταρράκτης κινασών) (**Εικόνα 11**). Συγκεκριμένα, οι κινάσες Raf φωσφορυλιώνουν τις κινάσες Mek οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις p42/44 MAPK ή ERK (55). Οι ERK εμφανίζονται σε αρκετές ισομορφές όπως οι ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8 και η Jun N-terminal kinase (JNK).

Οι ERK ρυθμίζουν την υπομονάδα του HIF-1α με τους εξής τρόπους :

- Επαγωγή της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α.
- Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2.



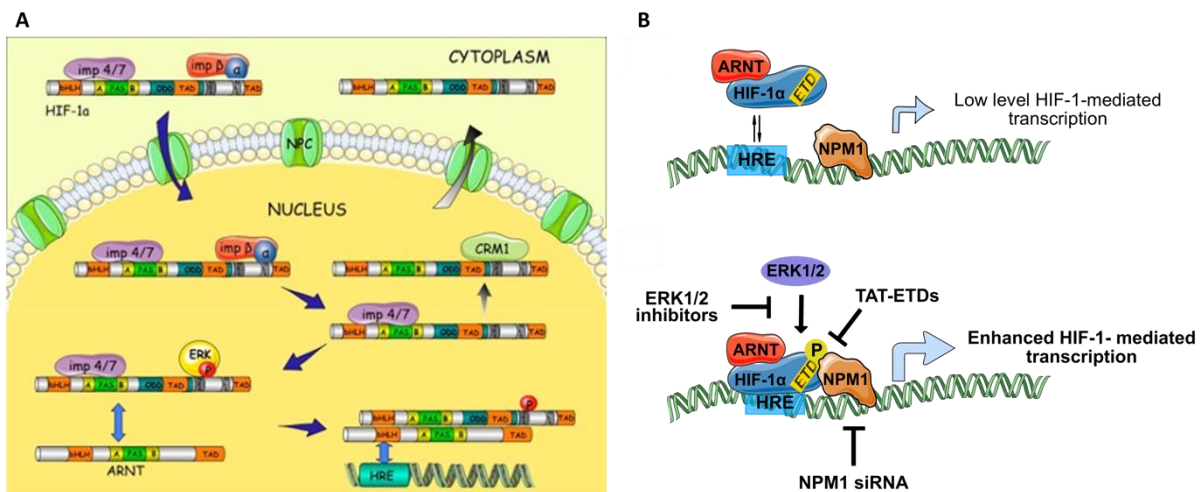
**Εικόνα 11** Το μονοπάτι των κινασών *p42/44* MAPK και *PI3K/AKT*. Διαγραμματική παρουσίαση της επίδρασης των κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών που επιδρούν στην δράση του *HIF-1α* (31).

Στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ταυτοποιήθηκαν δύο κατάλοιπα σερίνης (Ser641 και Ser643) που βρίσκονται στην ανασταλτική επικράτεια του HIF-1α ως θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Μεταλλάξεις που καταργούσαν τις θέσεις φωσφορυλίωσης (S->A) οδήγησαν σε αναστολή πυρηνικής συσσώρευσης του HIF-1α και συνεπώς σε μειωμένη ενεργότητα του. Αντίθετα, φωσφομιμητικές μεταλλάξεις στις Ser641 και Ser643 (Ser->Glu) οδήγησαν σε πυρηνική συσσώρευση και αυξημένη ενεργότητα (17).

Όταν τον μονοπάτι των ERK είναι ενεργό, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στις θέσεις Ser641 και Ser643 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απόκρυψη ενός εξαρτώμενου από την εξπορτίνη CRM-1 σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα. Έτσι, επιτυγχάνεται η συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και έπειτα ο ετεροδιμερισμός και η επαγωγή γονιδίων στόχων του. Αντιθέτως, όταν αναστέλλεται το μονοπάτι των ERK, ο HIF-1α δεν είναι φωσφορυλιωμένος και μπορεί να εξαχθεί από τον πυρήνα (17). Έτσι μετά την σταθεροποίησή του ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα μέσω των ιμφορτινών. Υπάρχουν οι πιθανές πορείες που παρουσιάζονται στην (εικόνα 11).

- Αντίθετα, αν το μονοπάτι MAPK/ERK είναι ανενεργό, όπως συμβαίνει σε ένα κύτταρο σε κατάσταση ηρεμίας, η CRM1 θα αναγνωρίσει το υδρόφοβο σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα -NES με αποτέλεσμα ο HIF-1α να εξέρχεται από τον πυρήνα. Στη συνέχεια η μη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α αναγνωρίζεται από μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (**βλ.Παράγραφο 1.6.3**) (43).
- Όταν η ERK1/2 είναι ενεργές (ως απάντηση στην υποξία ή σε άλλα ογκογόνα ερεθίσματα) η φωσφορυλίωση του HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζεται η αλληλουχία NES και κατά συνέπεια να μην αλληλεπιδρά έντονα με την εξπορτίνη CRM-1. Έτσι ο HIF-1α παγιδεύεται μέσα στον πυρήνα και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του (**εικόνα 11A**) (56).

Επίσης ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 επάγει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την NPM1 και έτσι να μεγιστοποιείται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Όπως αναφέρθηκε η σύνδεση του HIF-1 με την NPM1 επιτρέπει τη δημιουργία μιας σταθερής με στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs), καθιστώντας τη NPM1 συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων της υποξίας (**εικόνα 11B**) (44).



**Εικόνα 12** Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης της υπομονάδας του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2. **A)** Με ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στην ETD περιοχή του και αναστέλλεται η αλληλεπίδραση του με τις ERK1/2 (21). **B)** Απουσία φωσφορυλίωσης ο HIF-1α δεν αλληλεπιδρά με την NPM1 και η μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1 παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Αντίθετα φωσφορυλίωση του HIF-1α από ERK1/2 έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση με την NPM1, τη σταθερή δέσμευση σε HRE αλληλουχίες και αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-1 (44).

## 2.Σκοπός εργασίας

Η φωσφορυλίωση του HIF-1α έχει μεγάλη σημασία τόσο για τον υποκυτταρικό του εντοπισμό όσο και για την ενεργότητα του. Σε προηγούμενες μελέτες διαπιστώθηκε πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τη CK1δ στο κατάλοιπο S247 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας του καθώς επηρεάζει αρνητικά την αλληλεπίδρασή του με τον ARNT. Αντίθετα η φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2 τον ενεργοποιεί μέσω 2 μηχανισμών: καταργεί την αλληλεπίδραση του με τη CRM1 και ταυτόχρονα ενισχύει τη σύνδεσή του με την NPM1. Κύριος σκοπός της εργασίας αυτής είναι να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο αυτές οι 2 φωσφορυλίωσεις αν και έχουν αντίθετη δράση καταφέρνουν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του χωροχρονικά (fine tuning). Έτσι συνδυάζοντας σημειακές μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις φωσφορυλίωσης θελήσαμε να δούμε πως μέσω αυτών των αντίθετων δράσεων του HIF-1α ρυθμίζεται ο εντοπισμός σε υποκυτταρικά στοιχεία και η ενεργότητα του. Στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας ανέλυσα δεδομένα από φασματοσκοπία μάζας που προέρχονται από ανοσοκατακρήμνιση εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa 2 κατηγοριών:

- κύτταρα που δεν εξέφραζαν τον HIF-1α και αποτελούσαν το αρνητικό κοντρόλ του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης.
- κύτταρα που εξέφραζαν τη μεταλλαγμένη μορφή του HIF-1α (SDSA) που: 1) δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK με αποτέλεσμα ο HIF-1α να εντοπίζεται συνεχώς έξω από τον πυρήνα ενώ 2) παράλληλα ο HIF-1α φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη στη θέση S247 η οποία μιμείται τη φωσφορυλίωση από τη CK1δ και αποτρέπει την αλληλεπίδραση με τον ARNT.

Έτσι είναι δυνατόν να εντοπίσουμε τις πρωτεΐνες (κυρίως στο κυτταρόπλασμα) με τις οποίες αλληλεπιδρά αυτό το μετάλλαγμα του HIF-1α. Με αυτό τον τρόπο θα μπορέσουμε πιθανόν να συλλέξουμε στοιχεία για τις μη γενωμικές δράσεις του παράγοντα HIF-1α στο κυτταρόπλασμα.

Εν συνεχεία της βιοπληροφορικής ανάλυσης και με βάση προκαταρκτικά αποτελέσματα της υποψήφιας διδάκτορος κας Χρ. Αρσένη έγινε έλεγχος πιθανών αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκε τόσο το cDNA που κωδικοποιεί ένα τμήμα της αγρίου τύπου μορφής του παράγοντα HIF-1α (1-347 WT) όσο και της φωσφομιμητικής (1-347 S247D) αλλά και αυτό στο οποίο καταργείται η φωσφορυλίωση (1-347 S247A). Το cDNA του τμήματος 1-347 του HIF-1α σε όλες τις μορφές κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Στη συνέχεια έγινε επαγωγή της έκφρασης τους και καθαρισμός από βακτήρια. Σκοπός των παραπάνω είναι η πραγματοποίηση *in vitro* δοκιμής της αλληλεπίδρασης όπου ελέγχθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων μορφών του τμήματος HIF-1α 1-347 με εκχυλίσματα πλούσια σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 ΥΛΙΚΑ

##### 3.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα παρακάτω :

- **TOP10:** τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και είναι κατάλληλα για μετασχηματισμό εξωγενούς DNA. Χρησιμοποιήθηκαν κατά την πρώτη κλωνοποίηση που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατασκευές της κάθε μορφή του HIF-1α 1-347.
- **BL21 RIL:** αυτή η μετασχηματισμένη σειρά κυττάρων E.Coli χρησιμοποιείται ευρέως για την αυξημένη απόδοση ετερόλογης πρωτεϊνικής έκφρασης που παρέχουν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως διαθέτουν γονίδια για τα tRNA που μεταφέρουν τα αμινοξέα αργινίνη, ισολευκίνη και λευκίνη και προλίνη τα οποία φυσιολογικά είναι σπάνια στα κύτταρα E.Coli αγρίου τύπου. Επιπλέον παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη και μεγάλη ανθεκτικότητα στο μετασχηματισμό. Τέλος, διαθέτουν και σύστημα πρωτεϊνικής έκφρασης επαγόμενης από το IPTG.

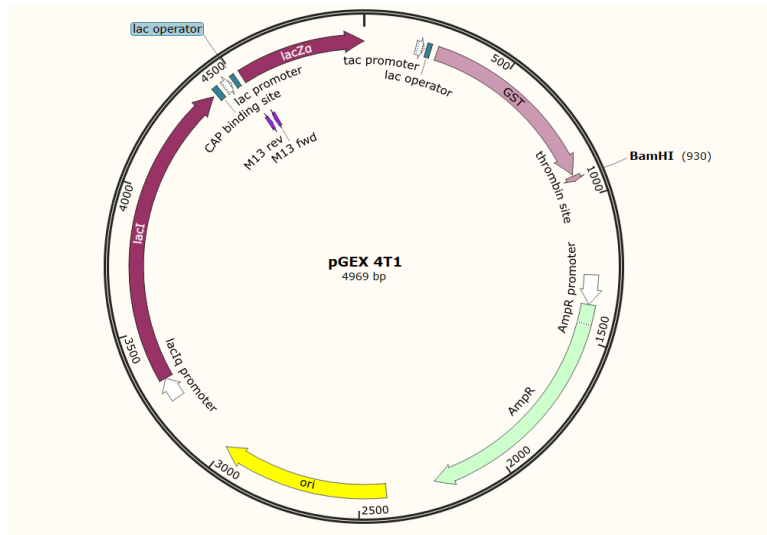
##### 3.1.2 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HeLa S3 (CVCL\_0058). Πρόκειται για ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας με χρόνο διπλασιασμού ~48 ώρες.

##### 3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- **pGEX4T1:** Το μέγεθος του φορέα όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα είναι 4.969 bp και περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Amp (αμπικιλίνη), οπερόνιο λακτόζης και στο 5' άκρο της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS, Multiple Cloning Site) διαθέτει περιοχή που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) η έκφραση της οποίας ελέγχεται από τον υβριδικό υποκινητή *tac* (βλ.εικόνα 13). Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEX-4T1 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση τμημάτων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, και συγκεκριμένα για τις μεταλλαγμένες μορφές της αμινοτελικής του περιοχής 1-347 (1-347 WT HIF-1α, 1-347 SA HIF-1α και 1-347 SD HIF-1α).
- **pCMV-FLAG:** σε αυτούς τους φορείς ήταν ήδη ενσωματωμένο των cDNA των μορφών του HIF-1α 1-347WT, 1-347SA, και 1-347SD. Οι κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να απομονωθούν τα cDNA ενθέματα ώστε να κλωνοποιηθούν τελικά στον φορέα pGEX4T1.



**Εικόνα 13** Ο πλασμιδιακός φορέας *pGEX4T1* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

### 3.1.4 Χημικά αντιδραστήρια και kit απομόνωσης

Τα **χημικά αντιδραστήρια** που χρησιμοποιούνται και αναφέρονται παρακάτω προέρχονται από τις εταιρίες Sigma Aldrich και AppliChem ενώ τα ένζυμα από τις εταιρείες New England Biolabs.

Τα **kit** που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Kit απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης το “PCR and Gel clean-up” (Macherey Nagel).
- Kit απομόνωσης DNA από υγρές βακτηριακές καλλιέργειες το “Plasmid Mini kit” (Macherey Nagel).

### 3.1.5 Ένζυμα (Ενδονουκλεάσες περιορισμού)

Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι ενδονουκλεάσες περιορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο στα πειράματα πέψης και απομόνωσης του ενθέματος από τον πλασμιδιακό φορέα pCMV-Flag (παρασκευαστική πέψη) όσο και για τον έλεγχο σωστής ενσωμάτωσης του ενθέματος (δοκιμαστική πέψη).

Στον **πίνακα 1** αναφέρονται συνοπτικά τα ένζυμα (της εταιρίας New England BioLabs® inc.) και ο σκοπός για τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν:

**Πίνακας 1** Ένζυμα περιορισμού και η χρήση τους

Ενδονουκλεάσες περιορισμού	Χρήση
BamHI	Παρασκευαστική πέψη φορέα <b>pCMV-FLAG</b> και <b>pGEX-4T1</b> για κλωνοποίηση
StuI και PstI	Διπλή πέψη σε καθαρό πλασμιδιακό DNA για έλεγχο προσανατολισμού
HindIII και PstI	Έλεγχος προσανατολισμού κλωνοποιήσεων
XhoI	Έλεγχος προσανατολισμού κλωνοποιήσεων

Για τις αντιδράσεις λιγάσης (ligation) χρησιμοποιήθηκε η DNA λιγάση T4. Επίσης για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης προστέθηκε η αλκαλική φωσφατάση CIP (Calfintestinal alkaline phosphatase) η οποία χρησιμοποιήθηκε για να αποκοπούν οι φωσφορικές ομάδες του φορέα pGEX-4T1 προκειμένου να μην ξαναγίνει ο φορέας κυκλικός χωρίς να προσλάβει το ένθεμα. Για τις πέψεις χρησιμοποιήθηκε το buffer cutsmart το οποίο είναι κατάλληλο για τα συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού.

### 3.1.6 Αντισώματα

Για την ταυτοποίηση των αντίστοιχων πρωτεϊνών σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western blot) χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα της εταιρίας Cell Signaling:

- anti-tubulin (αναγνωρίζει την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη). Χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα σε αραιώση 1:10.000.
- anti-GST (αναγνωρίζει την GST η οποία είναι μέρος κάθε χειμερικής πρωτεΐνης HIF-1α 1-347- SA/SD/WT). Χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα σε αραιώση 1:10.000.
- anti-mouse/ anti-goat χρησιμοποιήθηκαν ως δευτερεύοντα αντισώματα σε αραιώση 1:5.000 που φέρουν σε σύντηξη το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Για το αντίσωμα anti-goat οργανισμός προέλευσης είναι το ποντίκι και για το αντίσωμα anti-mouse είναι η αίγα.

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων φασματοσκοπίας μάζας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω βιοπληροφορικά εργαλεία:

1. **Genecodis**. Με το συγκεκριμένο εργαλείο έγινε μελέτη οντολογίας των αποτελεσμάτων από την φασματοσκοπία μάζας. (<https://genecodis.genyo.es/>,(57)).
2. **String**. Χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση με τον HIF-1α των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματοσκοπία μάζας (<https://string-db.org/>, (58)).
3. **GEPIA**. Χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1α και των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματοσκοπία μάζας σε διάφορους τύπους καρκίνου (59).

### 3.2.2 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Το cDNA αγρίου τύπου της αμινοτελικής περιοχής 1-347 του HIF-1α, το cDNA που φέρει τις μεταλλάξεις κατάργησης φωσφορυλίωσης από την κινάση CK1δ (S247A) αλλά και το cDNA της αμινοτελικής περιοχής 1-347 της υπομονάδας HIF-1α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (S247D) υπήρχαν ήδη κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα pCMV-Flag. Έτσι, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης τόσο των πλασμιδιακών φορέων pGEX-4T1 με το περιοριστικό ένζυμο BamHI (New England BioLabs®

inc.) όσο και των κατασκευών pCMV-Flag ώστε να απομονωθούν τα ενθέματα και να ενσωματωθούν εκ νέου στον φορέα pGex-4T1. Το ένζυμο BamHI χρησιμοποιήθηκε τόσο για την πέψη του pCMV -Flag όσο και για τον pGex-4T1.

Το μίγμα των πέψεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- ✓ 1μg DNA από τα πλασμίδια για κάθε ένθεμα
- ✓ 1x διάλυμα (buffer) κατάλληλο για κάθε ένζυμο
- ✓ 1 unit από το ένζυμο περιορισμού
- ✓ H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl.

Αρχικά μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις τόσο του φορέα pGEX-4T1 όσο και των pCMV-Flag φορέων, που ο καθένας έφερε διαφορετικό cDNA της αμινοτελικής επικράτειας του HIF-1α. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του nanodrop (**βλ. παράγραφο 4.2**). Η μέτρηση αυτή καθόρισε τις ποσότητες που προστέθηκαν από τους φορείς κατά την διαδικασία της πέψης (**βλ. πίνακα 7**). Και οι δύο αντιδράσεις επωάζονται στους 37°C για 1h και 30 min ενώ στην αντίδραση του pGEX-4T1 μετά την πάροδο 20 min γίνεται προσθήκη του CIP το οποίο αποκόπτει τις φωσφορικές ομάδες προκειμένου να μην ξαναγίνει ο φορέας κυκλικός χωρίς να προσλάβει το ένθεμα. Ακολούθησε έλεγχος με ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων (**βλ. παράγραφο 4.3**) σε πηκτή αγαρόζης 1% (σε 1X TAE Buffer και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων) στα 110 V προκειμένου να διαπιστώσουμε την επιτυχία των πέψεων. Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια λυχνίας UV για να απομονώσουμε τις επιθυμητές ζώνες από το πήκτωμα αγαρόζης (**Gel extraction, βλ. παράγραφο 3.2.4**).

### 3.2.3 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς

Τα δύο τμήματα DNA που απομονώσαμε τόσο του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1 όσο και του κάθε ενθέματος (1-347WT, 1-347SA, 1-347SD) μπορούν να συνδεθούν καθώς έχει γίνει πέψη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο (BamHI) και έτσι έχουν συμπληρωματικά άκρα. Η σύνδεση αυτή μονιμοποιείται με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση T4. Με τη βοήθεια της ποσοτικοποίησης των τμημάτων DNA που απομονώθηκαν στο nanodrop (**βλ. πίνακα 8**) έγινε υπολογισμός των κατάλληλων ποσοτήτων της αντίδρασης τόσο του ενθέματος όσο και το πλασμιδιακού φορέα (vector) με τη βοήθεια του Nebio calculator (**βλ. πίνακα 9**).

Για την αντίδραση λιγάσης το μίγμα περιείχε :

- ✓ Πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 και ένθεμα σε αναλογία 1:5.
- ✓ DNA λιγάση T4
- ✓ 1X Buffer της λιγάσης
- ✓ H<sub>2</sub>O

Η αντίδραση λιγάσης έγινε με ολονύκτια (overnight) επώαση στους 16 °C.



### 3.2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Η κίνηση των μορίων γίνεται σε υγρό μέσο (ρυθμιστικό διάλυμα) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται βάση του μεγέθους ή/και του φορτίου τους. Η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια απλή και αποτελεσματική μέθοδος που επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA ~ έως και 25kb. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων (το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο, λόγω των φορτισμένων φωσφοδιεστερικών δεσμών που διαθέτει) σε ένα πλέγμα (παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου καθορίζει την απόσταση που διανύουν τα φορτισμένα μόρια σε δεδομένο χρόνο, άρα και την ποιότητα διαχωρισμού. Η ταχύτητα μετακίνησης μορίων επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι το μέγεθός τους, η συγκέντρωση της πηκτής και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε 3 στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης ανάλογα με το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. Φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για το διαχωρισμό.
3. Χρώση του πηκτώματος με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και παρατήρηση του σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Μια τέτοια χημική ουσία είναι το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο ορατό φάσμα.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης με συγκέντρωση 1% w/v, ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40 mM Tris-Cl pH8.5, 20mM οξικό οξύ, 1mM EDTA), και βρωμιούχο αιθίδιο. Επιπλέον, πριν γίνει η φόρτωση των δειγμάτων προστέθηκε στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) το οποίο περιέχει κυανούν του ξυλενίου, βρωμοφαινόλη και γλυκερόλη η οποία προσδίδει ιζώδες στα δείγματα ώστε να μην διαχέονται στην πηκτή. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμινύεται αγαρόζη σε σκόνη με το ρυθμιστικό διάλυμα TAE και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται στο εκμαγείο και το αφήνουμε να κρυώσει, να δημιουργηθούν δηλαδή δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων των υδατανθράκων και να δημιουργηθεί τρισδιάστατο πλέγμα. Έπειτα φορτώνουμε τα δείγματα και εφαρμόζουμε ηλεκτρική τάση αφού εμβαπτίσουμε την πηκτή στο ρυθμιστικό διάλυμα.

## Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel Extraction)

Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση των επιθυμητών DNA ζωνών από το πήκτωμα αγαρόζης, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να καθαριστούν και να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις πέψης και κλωνοποίησης. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται σε ακτινοβολία UV. Το βρωμιούχο αιθίδιο απορροφά στο υπεριώδες φάσμα και εκπέμπει στα 590 nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα μόρια DNA (60). Με αυτόν τον τρόπο επιλέγουμε τις επιθυμητές ζώνες και τις κόβουμε με ειδικό νυστέρι. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Mini kit for gel extraction and PCR clean up της εταιρίας Macherey-Nagel. Σύμφωνα με αυτό, η απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται σε τρία βήματα: την τήξη του πηκτώματος σε ειδικό διάλυμα, τη σύνδεση του DNA σε μεμβράνη παρουσία αλάτων και τέλος την έκλυση του DNA.

Τα **υλικά** τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι :

- Gel Solubilization Solution (NT1)
- Wash Buffer (NT3)
- Elution Buffer (NE)

Η **μεθοδολογία** που ακολουθείται είναι:

- Μεταφορά των ζωνών που κόπηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης σε σωληνάκια τύπου erpendorf, όγκου 1,5 ml
- Ζύγισμα κάθε τμήματος του πηκτώματος και υπολογισμός του καθαρού βάρους κάθε κομματιού. Για κάθε 100 mg πηκτώματος προστίθενται 200 µl Solubilization Buffer (NT1). Στον **πίνακα 2** παρουσιάζονται τα τμήματα και οι αντίστοιχες μετρήσεις :

**Πίνακας 2 Αναλογία ποσοτήτων τμημάτων αγαρόζης και Buffer διαλυτοποίησης**

Τμήμα από πήκτωμα αγαρόζης	Ποσότητα (gr)	Ποσότητα NTS Buffer (µl)
1-347WT	0,37 gr	740 µl
pGEX-4T1	0,175 gr	300 µl
1-347SA	0,146 gr	250 µl
1-347SD	0,213 gr	400 µl

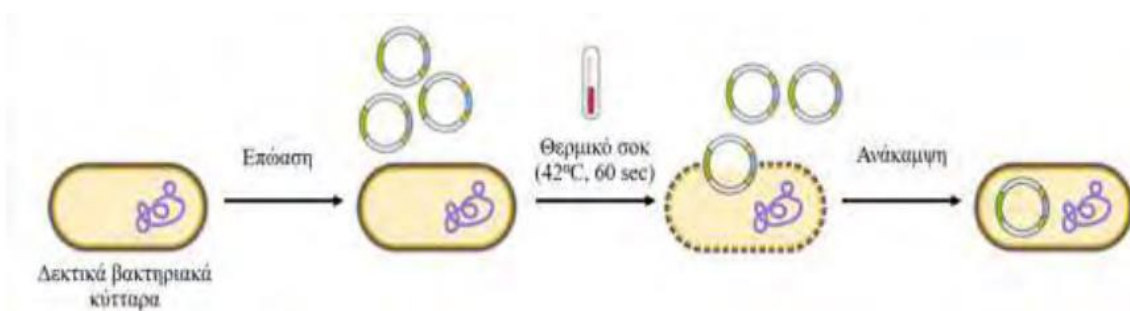
- Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 50 °C για περίπου 10 min μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα.
- Μεταφορά του όγκου που προκύπτει σε ένα Spin Filter και φυγοκέντριση στις 12500 rpm για 30 sec. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Προσθήκη 700 µl Wash Buffer (NT3) στο φίλτρο και φυγοκέντριση για 30 στις 12500 rpm. Απορρίπτεται το υγρό που έχει απομείνει στο σωληνάκι. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά.

- Για να απομακρυνθεί η περίσσεια αιθανόλης πραγματοποιείται φυγοκέντριση από τα σωληνάκια για 1 min στις 12500 rpm. Εναλλακτικά γίνεται επώαση των δειγμάτων για 2-5 min στους 70 °C ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Μεταφορά του φίλτρου σε νέα σωληνάκια όγκου 1,5 ml και προσθήκη προσεκτικά στο κέντρο του φίλτρου 15-30 μl Elution Buffer (NE). Επιάζουμε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 12500 rpm για 1 min.
- Μέτρηση της συγκέντρωσης στα 4 δείγματα (1-347WT, 1-347SA, 1-347SD, pGEX-4T1) στη συσκευή nanodrop (πίνακας 8).
- Ο τελικός όγκος κάθε διαλύματος φυλάσσεται στους 4 °C για σύντομο χρονικό διάστημα.

### 3.2.5 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli Top10 και BL21RIL

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμίδια μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με χημική κατεργασία και θερμικό σοκ όσο και με ηλεκτροδιάτρηση. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε θερμικό σοκ με σκοπό να δημιουργηθούν πόροι στην πλασματική μεμβράνη ώστε να μπορεί να γίνει η είσοδος του εξωγενούς γενετικού υλικού. Προκειμένου να προσλάβουν τα βακτήρια τον πλασμιδιακό φορέα τα επώασαμε στον πάγο και στη συνέχεια στους 42 °C για 1 min ώστε να δημιουργηθούν πόροι στη κυτταρική τους μεμβράνη. Έπειτα προσθέσαμε θρεπτικό υλικό και επώαση στους 37°C για 45'. Φυγοκεντρίθηκε και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Τέλος επιστρώσαμε τα βακτήρια σε στερεό θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής αμπικιλίνη (Amp) και έγινε ολονύκτια επώαση (overnight) για 16 h στους 37 °C .

Συνοπτικά η διαδικασία μετασηματισμού με θερμικό σοκ απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα :



**Εικόνα 27** Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA. (<https://www.thermofisher.com/qr/en/home.html>)

Με το ίδιο πρωτόκολλο έγινε και ο μετασηματισμός της κυτταρικής σειράς BL21RIL με τη διαφορά στη σύσταση σε αντιβιοτικά του θρεπτικού υλικού LB καθώς περιείχε επιπλέον χλωραμφαινικόλη.

### 3.2.6 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας μικρής και μεγάλης κλίμακας

Για τη δημιουργία καλλιέργειας μικρής κλίμακας έγινε επιλογή αποικιών από το τρυβλίο κάθε μεταλλάγματος οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και τοποθετήθηκαν υπό ανάδευση ολονύκτια (overnight) σε επωαστήρα στους 37 °C στα 170 rpm. Ο τελικός όγκος κάθε καλλιέργειας ήταν 3 ml. Για κάθε μετάλλαγμα επιλέχθηκαν 10 αποικίες και σε κάθε καλλιέργεια προστέθηκε και το αντιβιοτικό Amp (1μl/1000μl).

Για τη δημιουργία καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας προστέθηκε το θρεπτικό υλικό και 200μl από την καλλιέργεια μικρής κλίμακας και τα αντίστοιχα αντιβιοτικά. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες μέχρι η οπτική πυκνότητα να εντάσσεται στο διάστημα τιμών 0,4-0,5 .Η αρχική που απορρόφηση που μετρήθηκε για κάθε μετάλλαγμα ήταν 0,05 για κάθε ένα από τα δείγματα (GST1-347WT, GST1-347SA, GST1-347SD και GST-).

### 3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές υγρές καλλιέργειες μικρής και μεσαίας κλίμακας

#### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαλύματα A1,P2,P3. Οι συγκεντρώσεις και τα συστατικά αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 3:

#### **Πίνακας 3 Συστατικά και συγκεντρώσεις διαλυμάτων απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση**

<b>A1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
10 mM Tris-Cl pH 8,0	1% SDS	3M CH <sub>3</sub> COOK pH 5,1
1 mM EDTA	0,2N NaOH	

Μετά την overnight επώαση 3ml καλλιέργειας κυττάρων TOP10 στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση με θρεπτικό υλικό LB που περιείχε αντιβιοτικό επιλογής, οι 10 καλλιέργειες για κάθε πλασμιδιακή κατασκευή φυγοκεντρίθηκαν στις 4000rpm για 15 min στους 4°C για 90 δευτερόλεπτα. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν στο ίζημα 150 μl **διαλύματος επαναιώρησης A1** (Resuspension buffer). Το ίζημα αιωρήθηκε υπό ανάδευση. Το διάλυμα αυτό περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH = 8 και EDTA το οποίο δεσμεύει το Mg<sup>2+</sup> ώστε ελαττωθεί η δραστηριότητα των νουκλεολυτικών ενζύμων. Επίσης περιέχει RNase για τον κατακερματισμό του RNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 150 μl **διαλύματος λύσης P2**, και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Τόσο το SDS όσο και το NaOH που περιέχει το διάλυμα P2 λύνουν τις κυτταρικές μεμβράνες και επιπλέον το NaOH μετατρέπει το dsDNA σε ssDNA.

Έπειτα προστέθηκαν 175 μl **διαλύματος εξουδετέρωσης P3** με έντονη ανακίνηση με το χέρι. Το SDS αλληλεπιδρά με το K<sup>+</sup> σχηματίζει άλας με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να καταβυθίζονται. Έτσι στο διαλυτό κλάσμα βρίσκεται το πλασμιδιακό DNA. Το γονιδιωματικό DNA καταβυθίζεται με την προσθήκη οξίνου διαλύματος K<sup>+</sup> καθώς είναι κυρίως μονόκλωνο λόγω μεγέθους. Αμέσως μετά ακολούθησε φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα στις 4000rpm για 20 min στους 4°C, και απομονώθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα που

απορρίφθηκε περιείχε πρωτεΐνες, λιπίδια και χρωμοσωμικό DNA ενώ στο υπερκείμενο περιέχει το πλασμιδιακό DNA, RNA και τα διάφορα άλατα (EDTA ,SDS).

Στη συνέχεια, προστέθηκαν **400 μl ισοπροπανόλης** και τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  . Η προσθήκη αλκοόλης μείωσε την πολικότητα του διαλύματος με αποτέλεσμα να γίνεται πιο δύσκολος ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ νερού και DNA. Το DNA είναι διαλυτό στο νερό αλλά αδιάλυτο στις αλκοόλες. Έτσι έγινε προετοιμασία του διαλύματος για κατακρήμνιση του γενετικού υλικού.

Στα τελευταία βήματα, έγινε φυγοκέντριση με μέγιστη ταχύτητα για 20 λεπτά (13400 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$ ). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και αφαιρέθηκαν τα υπολείμματα ισοπροπανόλης με πιπέτα. Τέλος το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με το “Plasmid mini kit” της εταιρίας Macherey-Nagel**

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από υγρές βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης και το kit απομόνωσης της εταιρίας Macherey-Nagel.

Την επόμενη μέρα μετά την (overnight) επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  στα 170 rpm προστέθηκαν 5-10 ml της καλλιέργειας σε erpedorf και ακολούθησε φυγοκέντριση για 30s στα 11.000xg . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο pellet προστέθηκαν 500 μl **διάλυματος επαναιώρησης A1** υπό ελαφριά ανάδευση και στη συνέχεια 500 μl **διάλυμα λύσης A2** και ακολούθησε επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστέθηκε **διάλυμα εξουδετέρωσης A3** και τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στα 11.000xg για 10 min και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλες καθαρισμού. Τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στα 11.000xg για 1 min ώστε να προσδεθεί το DNA στη στήλη. Ακολούθησε ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη διαλύματος πλύσης 500 μl **AW** το οποίο είχε αρχικά προθερμαθεί στους  $50^{\circ}\text{C}$  και φυγοκέντριση στα 11.000g για 1 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν στη στήλη 600 μl **διάλυμα A4** με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνθηκαν από τη στήλη άλατα και πρωτεϊνικά υπολείμματα. Τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στα 11.000xg για 1 min . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η στήλη φυγοκεντρίθηκε για 2 min στα 11.000g ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα A4 το οποίο περιέχει αιθανόλη και ενδέχεται να επηρεάσει μετέπειτα τις ενζυμικές αντιδράσεις. Τέλος, προστέθηκαν στην στήλη 50 μl **διαλύματος έκλουσης A4** το οποίο είχε αρχικά προθερμαθεί στους  $70^{\circ}\text{C}$  και φυγοκεντρίθηκε η στήλη στα 11.000g για 1 min.

### **3.2.8 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων με IPTG (isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyrasonide)**

Μετά την ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας των κυττάρων BL21RIL πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κάθε καλλιέργειας με σκοπό να διαπιστωθεί η επιτυχής βακτηριακή ανάπτυξη. Η απορρόφηση στα 600nm και για τις 4 καλλιέργειες ρυθμίστηκε στο 0,05. Λήφθηκαν 2 ml από κάθε υγρή καλλιέργεια και

προστέθηκαν σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με 200 ml LB, 200 μl Amp και 200 μl χλωραμφαινικόλη. Ακολούθησε επώαση για 2 h υπό συνεχή ανάδευση στους 37 °C ώστε το OD<sub>600</sub> να προσεγγίσει το διάστημα τιμών 0,4-0,5. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με 0.1mM IPTG και επώαστηκαν για 2h υπό συνεχή ανάδευση στους 28°C. Ο ισοπρόπυλοθειογαλακτοζίτης (IPTG) είναι ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 22** στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 η περιοχή του υποκινητή της β-γαλακτοσιδάσης προηγείται της περιοχής πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώθηκε το cDNA. Έτσι η επαγωγή του γονιδίου της έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του εξωγενούς γενετικού υλικού που βρίσκεται ενσωματωμένο στο φορέα. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια φυγοκεντρίθηκε στις 4000 rpm στους 4°C για 15 min και αμέσως μετά απορρίφθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό. Έγινε πλύση του ιζήματος κυττάρων με dH<sub>2</sub>O. Ακολούθησε ακόμα μία φυγοκέντρισης των καλλιιεργειών στις 4000 rpm στους 4 °C για 15 min και απορρίφθηκε ξανά το υπερκείμενο. Τα ιζήματα των κυττάρων διατηρήθηκαν στους -20 °C.

### 3.2.9 Καθαρισμός πρωτεΐνης από βακτηριακά κύτταρα

Την επόμενη μέρα, το ίζημα κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 8 ml κατάλληλου buffer. Για πρωτεΐνες με GST-tag η σύσταση του buffer που χρησιμοποιείται είναι :

- 20 mM Tris pH=7,5
- 150 mM NaCl
- 1mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών)
- 5mM MgCl<sub>2</sub> ( σταθερότητα πρωτεϊνών και μεταβολιτών όπως το ATP)
- 1% Triton X-100 ( λύση λιπιδιακής διπλοστιβάδας)
- 1mM DTT ( αναστολή οξειδωσης πρωτεϊνών)
- Αναστολείς πρωτεασών κυστεΐνης και ασπαρτικού

Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε ισχύ 65 –70 στη συσκευή ηπερήχων Vibra-Cell, 10 φορές ανά 10 sec με ενδιάμεσες παύσεις των 30 sec. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος. Το παραπάνω εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε μετά τους υπερήχους στις 10000 rpm στους 4 °C για 30 min. Τόσο από το υπερκείμενο όσο και από το ίζημα κρατήθηκε δείγμα( sup sample και pellet sample αντίστοιχα ). Το pellet sample αρχικά επαναιωρήθηκε στο buffer λύσης. Προστέθηκε επίσης DTT και Laemmli buffer, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον **πίνακα 4**. Τέλος διαχωρίστηκε το διαλυτό από το αδιάλυτο κλάσμα.

Ακολούθησε ο καθαρισμός. Το πρωτόκολλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται συνοπτικά παρακάτω:

- Προστέθηκαν σε σωλήνες τύπου falcon 120 μl σφαιρίδια glutathione –sepharose και ακολούθησαν 3 X 10 min πλύσεις με το buffer λύσης που είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα βήματα. Μετά από την επώαση υπό ανάδευση των 10 min φυγοκεντρήθηκαν για 1,5 min στους 4 °C στα 1500 rpm.

- Προστέθηκε το υπερκείμενο στα σφαιρίδια glutathione–Sepharose και η στήλη επώαστηκε υπό ανάδευση για 1 h στους 4 °C .
- Έγιναν 3 X 10 min πλύσεις με το buffer λύσης με ενδιάμεση φυγοκέντριση όπως σε προηγούμενο στάδιο. Αφαιρέθηκε το υγρό από τα σφαιρίδια.

Ακολούθησε έκλυση με γλουταθειόνη σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Cl (**πίνακας 5**). Κατά τις εκλούσεις η γλουταθειόνη που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση 10 μΜ. Τα σφαιρίδια επώαστηκαν για 5 min υπό ελαφριά ανακίνηση και έπειτα φυγοκεντρίθηκαν στις 1000 rpm για 3 min. Πραγματοποιήθηκαν 3 εκλούσεις. Έτσι από το υπερκείμενο κάθε έκλυσης λήφθηκε δείγμα 10 μl (elution sample) και προστέθηκε γλυκερόλη.

Το δείγμα από κάθε έκλυση αποθηκεύτηκε σε 30 μl γλυκερόλης. Η γλυκερόλη κατά την αποθήκευση πρωτεϊνών συμβάλλει στην βελτίωση της σταθερότητάς τους.

**Πίνακας 4: Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος Laemmli buffer**

Συστατικά
50 mM Tris pH 6,8
2% SDS
0,1% κυανό της βρωμοφαινόλης
10% γλυκερόλη
100mM DTT

**Πίνακας 5 : Συσταση διαλύματος γλουταθειόνης**

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCL pH = 8,5	50mM
Γλουταθειόνη	10 mM

### 3.2.10 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματομετρική ποσοτική μέθοδος η οποία βασίζεται στο γεγονός πως η μέγιστη απορρόφηση όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue μεταβάλλεται από τα 465nm στα 595nm όταν παρατηρηθεί αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Η χρωστική προσδένεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, και ιδιαίτερα στην αργινίνη, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος. Το σύμπλοκο εμφανίζεται σε 5 min και παραμένει σταθερό για περίπου 1h και δεν επηρεάζεται από ουσίες που συνήθως απαντώνται σε πρωτεϊνικά διαλύματα όπως ιόντα  $K^+$ ,  $Na^+$  κλπ. Η απορρόφηση στα 595nm εμφανίζει άμεση συσχέτιση με τη συγκέντρωση τη πρωτεΐνης και υπολογίζεται με ακρίβεια με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα των εκλούσεων προκειμένου να υπολογίσουμε την ποσότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία καθαρισμού τους (**πίνακας 10**). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε κατά την απομόνωση μικροσωληνίσκων όπου μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής απομόνωσή τους και να υπολογιστεί η συγκέντρωσή τους.

### 3.2.11 Ανάλυση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE

Η πιο συχνή ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι σε αποδιατακτικές συνθήκες των πρωτεϊνικών μορίων, παρουσίας περίσσειας αρνητικού φορτίου, που εξασφαλίζεται από το SDS. Η τεχνική ονομάζεται ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου-SDS υπό συνθήκες μετουσίωσης. Ως αποδιατακτικό μέσο χρησιμοποιείται δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate/SDS), ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης. Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σε αυτές με καθορισμένη κατά βάρος αναλογία (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα με το SDS έχουν καθορισμένη επιμήκη μορφή και καθαρό αρνητικό φορτίο. Επίσης χρησιμοποιείται και β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθριετόλη, ουσίες οι οποίες ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Το πήγμα πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται κατά τον συμπολιμερισμό ακρυλαμιδίου και δι-ακρυλαμιδίου. Το πολυμερές πλέγμα φέρει πόρους το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού και τη συγκέντρωση μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού ελεύθερων ριζών με την προσθήκη υπερθειϊκού αμμωνίου και του φωτοχημικού καταλύτη TEMED (N,N,N,N –τετραμέθυλο1,2-διάμινο-αιθάνιο) για την έναρξη του πολυμερισμού. Λόγω του ότι το φορτίο είναι σταθερό ανά μονάδα μάζας, η κινητικότητα των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πήγματα, το πήγμα επιστοίβαξης (stacking gel), που είναι υπεύθυνο για τη συμπύκνωση πρωτεϊνών πριν αρχίσει ο διαχωρισμός τους και το πήγμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό πρωτεϊνών. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται αυτά τα δύο πηκτώματα διαφέρουν να προς τη σύσταση και το pH τους.

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού (separating gel) περιεκτικότητας 10% σε ακρυλαμίδιο. Η πηκτή επιστοίβαξης είχε την ίδια περιεκτικότητα και δημιουργήθηκαν θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων με ειδική μήτρα (comp) 10 θέσεων. Μετά την κατασκευή της πηκτής οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer). Παράλληλα στα δείγματα τα οποία στη συνέχεια φορτώθηκαν προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης και θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 min. Η φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή έγινε με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton και η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 150 V.

### 3.2.12 Χρώση των πρωτεϊνών της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης οι διαχωρισμένες πλέον πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρώση της πηκτής σε διάλυμα Coomassie Brilliant Blue σε μεθανόλη και οξικό οξύ. Η διαδικασία διαρκεί 10 λεπτά και γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η χρωστική αυτή βάφει τις πρωτεΐνες και την πηκτή με ένα βαθύ κυανό χρώμα. Στη συνέχεια ακολουθεί αποχρωματισμός (distaining) της πηκτής με μεθανόλη και οξικό οξύ για 1-2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση με αποτέλεσμα η χρωστική να απομακρύνεται από την πηκτή αλλά όχι από τις πρωτεΐνες. Έπειτα απομακρύνεται το διάλυμα αποχρωματισμού με επώαση της πηκτής σε νερό για 30min. Έτσι οι πρωτεΐνες εμφανίζονται ως μπλε ζώνες σε ανοιχτόχρωμο φόντο.



Η σύσταση του διαλύματος χρώσης είναι: 0,1 % w/v Coomassie Brilliant Blue , 50% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH) και ddH<sub>2</sub>O.

Η σύσταση του διαλύματος αποχρωματισμού είναι: 20% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ.

### 3.2.13 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών είναι μια εργαστηριακή τεχνική η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε ειδική μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF) και την επακόλουθη ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Αρχικά, πραγματοποιείται μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή στην οποία τοποθετούνται χαρτιά Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη μεμβράνης, μεμβράνη PVDF και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη PVDF είναι πιο υδρόφοβη από της νιτροκυτταρίνης και έτσι συγκρατεί ισχυρότερα τις πρωτεΐνες. Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε 100% μεθανόλη για 3-5 min και στην συνέχεια εμποτίζεται μαζί με την πηκτή και το χαρτί σε Transfer Buffer. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται στα 80mA για 1 ώρα. Στη συνέχεια προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία μεταφοράς των πρωτεϊνών πραγματοποιείται χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau S η οποία χρωματίζει αντιστρεπτά τις πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Η απομάκρυνση της χρωστικής γίνεται με πλύσεις της μεμβράνης με νερό. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με κατάλληλο διάλυμα 2% BSA για 1h ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές της μεμβράνης με PBS-Tween 20 και στη συνέχεια ακολουθεί ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το κατάλληλο αντίσωμα σε συγκεκριμένη κάθε φορά αραίωση. Την επόμενη μέρα το πρώτο αντίσωμα απομακρύνθηκε με πλύσεις με το ίδιο διάλυμα και ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου 1h που αναγνωρίζει το πρώτο. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα λουμινόλης στο οποίο προστέθηκε υπεροξειδίο του υδρογόνου και κουμαρικό οξύ. Το δεύτερο αντίσωμα που προστέθηκε ήταν συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση η οποία αντιδρώντας με το υπεροξειδίο δημιουργεί ρίζες υπεροξειδίου. Οι ρίζες στη συνέχεια αντιδρούν με το κουμαρικό οξύ το οποίο δρα ως ενισχυτής της χημειοφωταύγειας με αποτέλεσμα να παράγονται ρίζες κουμαρικού οξέος οι οποίες αντιδρούν με λουμινόλη. Το αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων είναι η εκπομπή φωτός. Τέλος, το σήμα της χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται και φωτογραφίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού εξοπλισμού.

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα :

- 100 ml λουμινόλης (0,022 gr/100 ml Tris-HCL pH 8,5 C=0,1M)
- 100μl κουμαρικού (0,0112 gr/10 ml DMSO)
- 30 μl H<sub>2</sub>O 30% V/V

Επιπλέον η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζεται στον **πίνακα 6**:

**Πίνακας 6 Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της ανοσοαποτύπωσης**

Σύσταση διαλυμάτων
<b>Transfer buffer:</b> 125 mM Tris Borate pH 8,5, 0,2% w/v SDS, 0,5mM DTT
<b>Ponceau S:</b> 2% w/v Ponceau, 30% v/v τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% v/v σουλφοσαλικυλικό οξύ.
<b>PBS-Tween 20:</b> 0, 1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

### 3.2.14 Παρασκευή εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa

Για την απομόνωση εκχυλισμάτων πλούσιων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από καλλιέργειες HeLa κυττάρων. Παρακάτω συνοψίζονται με τη σειρά τα βήματα:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από 6 τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων HeLa.
2. Προσθήκη 1ml 1X PBS για πλύση των κυττάρων, το οποίο στη συνέχεια αφαιρείται.
3. Προσθήκη 200 μl PME buffer (**βλ. παράγραφο 3.2.15**) και με τη βοήθεια scraper απομάκρυνση των κυττάρων και τοποθέτηση τους σε erpendorf.
4. Ακολούθησε μηχανικό σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος με σύριγγα ινσουλίνης σε υπότονο διάλυμα (PME) και παραμονή των κυττάρων σε πάγο για 10 min.
5. Προσθήκη 800 μl PME buffer.
6. Φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου στα 100.000g για 60 min στους 4 °C και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου.

### 3.2.15 Πρωτόκολλο απομόνωσης μικροσωληνίσκων

Οι πλειονότητα των κυττάρων διαθέτουν στο κυτταρόπλασμα τους ένα εκτεταμένο δίκτυο πρωτεϊνικών ινωδών δομών οι οποίες συγκροτούν τον κυτταροσκελετό. Οι μικροσωληνίσκοι είναι δυναμικές δομές που αποτελούνται από ετεροδιμερή α-β-τουμπουλίνης και συμμετέχουν ενεργά στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (61). Οι μικροσωληνίσκοι χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο δυναμικής αστάθειας (dynamic instability) εξαιτίας της ταχείας υδρόλυσης GTP της β τομπουλίνης που επιτρέπει την ταχεία εναλλαγή κύκλων αύξησης και συρρίκνωσης τους. Η ιδιότητά τους αυτή τους επιτρέπει να συμμετέχουν σε αρκετές κυτταρικές διαδικασίες όπως την κυτταρική κίνηση και την ενδοκυτταρική μεταφορά, με τη σημαντικότερη αυτή της μίτωσης.

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και κυρίως κατά την μιτωτική φάση η δυναμική των μικροσωληνίσκων ποικίλλει καθώς απαιτείται για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Έτσι, εξαιτίας του κεντρικού ρόλου των μικροσωληνίσκων στη μίτωση και ιδιαίτερα κατά τη φάση της ανάφασης τα φάρμακα που επιδρούν στην συναρμολόγησή τους χρησιμεύουν στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, η ταξόλη (taxol) ή πακλιταξέλη παρεμποδίζει την κυτταρική διαίρεση σταθεροποιώντας τη δομή των

μικροσωληνίσκων (62). Ειδικότερα, συνδέεται με την β τουμπουλίνη-GDP στην ενδοαυλική περιοχή, προάγοντας τόσο τον έντονο πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων όσο και τη σταθεροποίηση του συναρμολογημένου πολυμερούς (63).

Επιπλέον, οι πολυμερισμένοι μικροσωληνίσκοι παρουσία πακλιταξέλης προστατεύονται από την αποσυναρμολόγηση τους που συνήθως προκαλείται από την επεξεργασία με κρύο ή ασβέστιο (64). Εκτός από τη χρησιμότητά της στη θεραπεία του καρκίνου, η πακλιταξέλη χρησιμοποιείται επίσης ευρέως στην κυτταρική βιολογία εξαιτίας της ιδιότητας να σταματά την κυτταρική διαίρεση σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου. Προκειμένου λοιπόν να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση της τουμπουλίνης με τα μεταλλάγματα 1-347 HIF-1α χρειάστηκε να απομονωθούν κυτταρικά εκχυλίσματα πλούσια σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων και να σταθεροποιηθούν οι μικροσωληνίσκοι προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης τουμπουλίνης με αυτά. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα κυττάρων όπως περιγράφεται στην **παράγραφο 3.2.15**. Αμέσως μετά την φυγοκέντρηση ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση Bradford (**βλ. παράγραφο 3.2.10**) ώστε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη πρωτεϊνών ενώ στο ίζημα κατακρημνίστηκαν οι μικροσωληνίσκοι και οι συνοδές πρωτεΐνες τους όπως η τουμπουλίνη. Στη συνέχεια ακολουθούν τα στάδια :

- Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρήθηκε και μετρήθηκε ο όγκος του διαλύματος επαναιώρησης ώστε να προστεθεί ταξόλη σε τελική συγκέντρωση 20 μM. Η αντίδραση επάγεται για 15 -20 min στους 37 °C.

Στο στάδιο αυτό η ταξόλη επάγει τον πολυμερισμό των υπομονάδων της τουμπουλίνης.

- Προσθήκη σε σωλήνα φυγοκέντρησης 0,5 ml PME Sucrose Buffer προθερμασμένο στους 37 °C , 0,5 ml από το υπερκείμενο και 1 ml Buffer.
- Φυγοκέντρηση 13.000 rpm στους 20 °C για 30 min.
- Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου.  
Αυτό το βήμα μειώνει το κίνδυνο επιμόλυνσης του pellet των μικροσωληνίσκων από διαλυτές πρωτεΐνες .
- Επαναιώρηση του ιζήματος με PME Buffer το οποίο περιέχει συγκέντρωση 10 mM paclitaxel.

Τα buffer και οι ποσότητες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται παρακάτω:

<b>PME Buffer (10ml)</b>		<b>PME Sucrose solution (25 ml)</b>	
0,1M <b>MES</b> (pH 6,9)	1ml	0,1M <b>MES</b> (pH 6,9)	2,5ml
2mM <b>EGTA</b>	80μl	2mM <b>EGTA</b>	200μl
1mM <b>MgSO<sub>4</sub></b>	100μl	1mM <b>MgSO<sub>4</sub></b>	250μl
1mM <b>DTT</b>	10μl	1mM <b>DTT</b>	25μl
0,1mM <b>GTP</b>	10μl	0,1mM <b>GTP</b>	25μl
1mM <b>AEBSF</b>	100μl	1mM <b>AEBSF</b>	250μl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	8,7 ml	20mM <b>Taxol</b>	12,5 μl
		10% w/v <b>Σουκρόζη</b>	2,5 gr
		<b>dH<sub>2</sub>O</b>	21,735 ml

### 3.2.16 Πειράματα συγκατακρήμισης (pulldown assays)

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την αλληλεπίδραση των διαφορετικών μορφών του HIF-1α με την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική συγκατακρήμισης (pulldown assay) που επιτρέπει την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αγχιστεία που εμφανίζουν χιμαιρικές GST πρωτεΐνες με τα σφαιρίδια στήλης γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Οι GST πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται δηλαδή ως δόλωμα. Για το σκοπό αυτό καθλώνονται στα σφαιρίδια και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα ή καθαρή πρωτεΐνη μπορεί να ελεγχθεί ο αριθμός και το είδος πρωτεϊνών που παρουσιάζουν αγχιστεία με αυτές της στήλης.

Στο πείραμα που έγινε χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, ως “δολώματα” τα πρωτεϊνικά τμήματα της αμινοτελικής επικράτειας του HIF- 1α (1-347) με επίτοπο το GST ( S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης ) και ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση κάθε μορφής με την πρωτεΐνη τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Εξισορρόπηση των σφαιριδίων με 3 πλύσεις διάρκειας 10 λεπτών η καθεμία, στους 4°C, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Δέσμευση στα σφαιρίδια των πρωτεϊνών σύντηξης, η οποία έγινε υπό ανακίνηση στους 4°C για 1 ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν 10μg από κάθε πρωτεΐνη.
- Φυγοκέντρηση στις 3000rpm, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και ακολούθησαν 3 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα, διάρκειας 10 λεπτών η καθεμία, στους 4°C.
- Προσθήκη του κυτταρικού εκχυλίσματος μικροσωληνίσκων από εκχυλίσματα κυττάρων HeLa. Η αντίδραση επώαστηκε ολονύκτια με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης) υπό ανακίνηση στους 4°C.
- Την επόμενη μέρα και μετά από φυγοκέντρηση στις 3000rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου, έγιναν 3 δεκάλεπτες πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα στους 4°C.
- Ακολούθησε έκλουση των πρωτεϊνικών συμπλόκων με διάλυμα γλουταθειόνης και, έπειτα από προετοιμασία των δειγμάτων (προσθήκη διαλύματος φόρτωσης και DTT, θέρμανση στους 95°C), έγινε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Τελικό βήμα ήταν η ανοσοαποτύπωση με συγκεκριμένα αντισώματα για να ελεγχθεί η ύπαρξη της πρωτεΐνης τομπουλίνης.

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Buffer	Συγκέντρωση
Hepes pH7.5	25 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
TritonX-100	1%
PMSF	100 mM

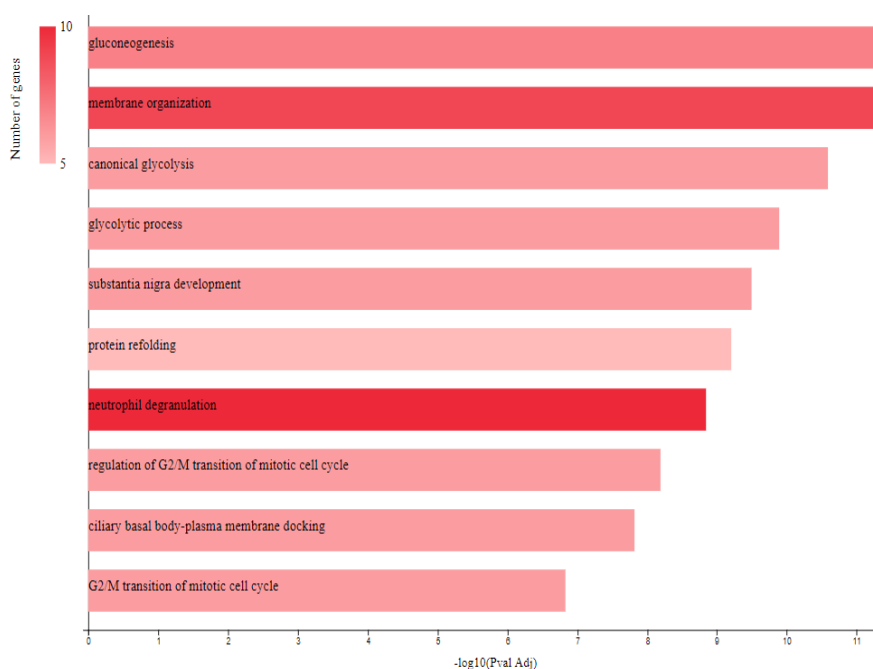
Η σύσταση του διαλύματος έκλουσης γλουταθειόνης ήταν: 20mM Tris/HCl pH=8.5 , 10mM γλουταθειόνη και H<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό επιθυμητό όγκο.

## 4.Αποτελέσματα

### 4.1 Οντολογική βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων φασματοσκοπίας μάζας

Η βιβλιοθήκη αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από την φασματοσκοπία μάζας προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-1α SDSA αναλύθηκαν στις πλατφόρμες βιοπληροφορικής ανάλυσης Gencodis, String και Gepia και τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω.

#### Βιοπληροφορική ανάλυση με το πρόγραμμα Gencodis

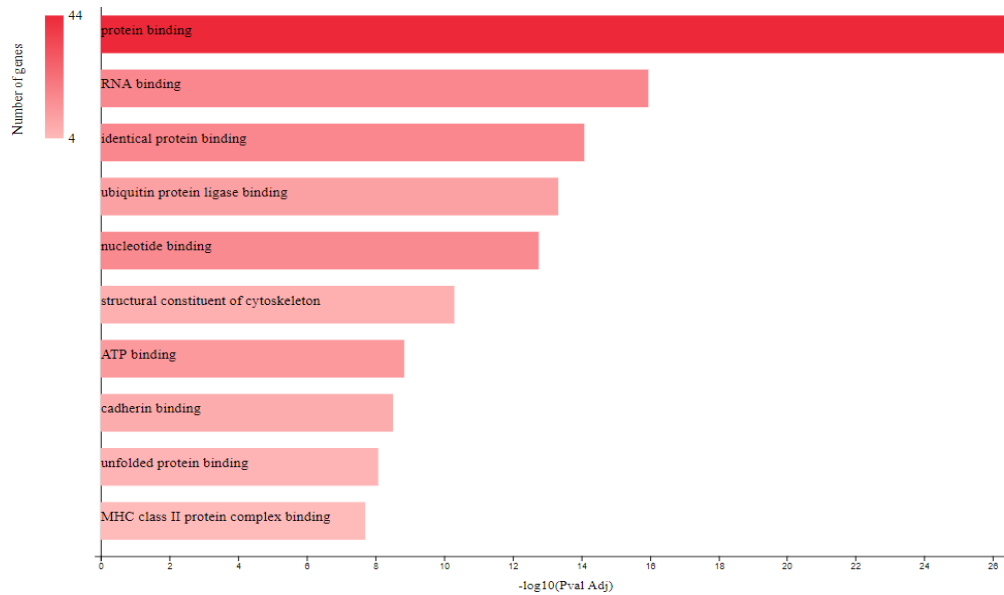


**Εικόνα 13.** Αποτελέσματα ανάλυσης με το Gencodis. Απεικόνιση των κυτταρικών διαδικασιών (Biological Process) στις οποίες συμμετέχουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α (SDSA). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή bar chart με την ένταση του χρώματος να είναι ανάλογη του αριθμού των γονιδίων.

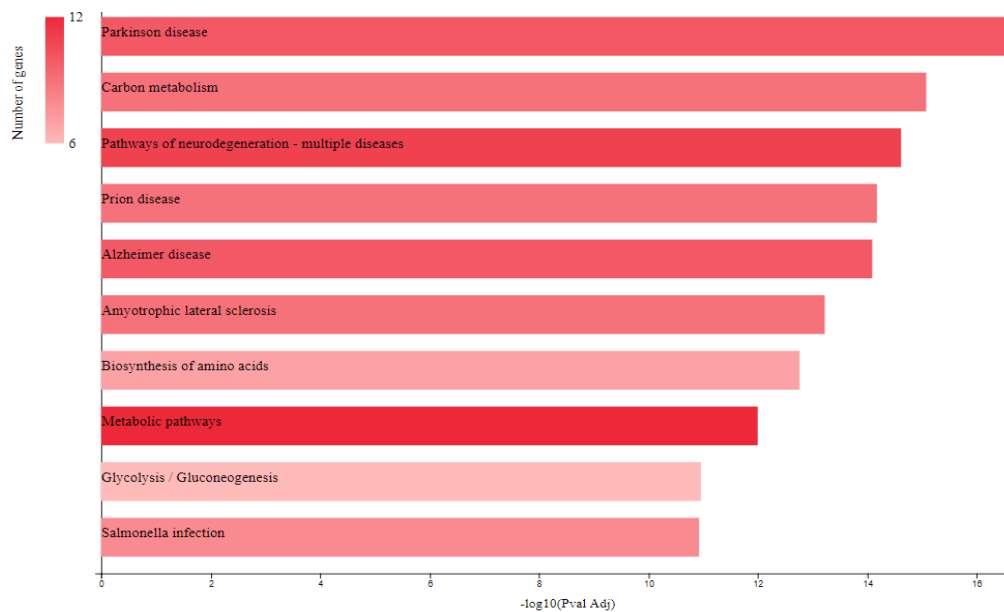
Στο διάγραμμα της **εικόνας 13** απεικονίζεται ο αριθμός των γονιδίων πρωτεϊνών τα οποία που προέρχονται από την ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας και συμμετέχουν σε συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες. Οι σημαντικότερες είναι η οργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης, η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και οι διαδικασίες μεταβολισμού με βασικότερη τις διεργασίες γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι κυτταρικές λειτουργίες που συμμετέχουν αυτές οι πρωτεΐνες. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την HIF-1α SDSA μορφή όπως φαίνεται και στο διάγραμμα συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και αλλά και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών με νουκλεϊκά οξέα (RNA) (**εικόνα 14**). Τέλος, στην τελευταία ανάλυση στο Gencodis εντοπίστηκαν τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες και η σημασία τους για την εμφάνιση πολλών ασθενειών όπως η νόσος του

πάρκινσον (Parkinson disease), διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα αλλά και μεταβολικές οδοί οι οποίες συμμετέχουν στην προώθηση της καρκινογένεσης (εικόνα 15).



**Εικόνα 14.** Αποτελέσματα *Gencodis*. Απεικόνιση των κυτταρικών λειτουργιών (*molecular function*) στα οποία συμμετέχουν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα *HIF-1α* (*SDSA*). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή *barchart* με την ένταση του χρώματος να είναι ανάλογη του αριθμού των γονιδίων.

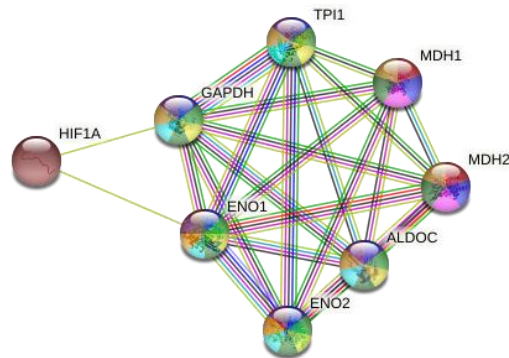


**Εικόνα 15.** Αποτελέσματα *Gencodis*. Απεικόνιση των ασθενειών με μεγαλύτερη συσχέτιση με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα *HIF-1α* (*SDSA*). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή *barchart* με την ένταση του χρώματος να είναι ανάλογη του αριθμού των γονιδίων.

## Βιοπληροφορική ανάλυση με το πρόγραμμα String

Τα αποτελέσματα από το Gencodis που αφορούσαν τις κυριότερες κατηγορίες της οντολογικής ανάλυσης αναλύθηκαν με την πλατφόρμα String για την συσχέτιση τους με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α.

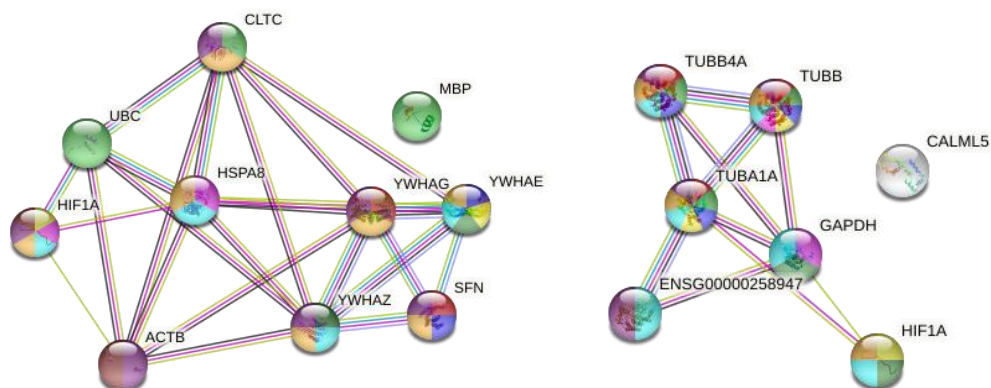
Αρχικά έγινε η ανάλυση των πρωτεϊνών που ανήκουν στις διεργασίες της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης



**Εικόνα 16.** Αποτελέσματα String. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από το Gencodis χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά HIF-1α (SDSA) και συμμετέχουν στη γλυκόλυση/γλυκονεογένεση.

Με βάση την παραπάνω ανάλυση ένζυμα της γλυκόζης όπως η ενολάση, αλδολάση και η GAPDH που αποτελούν και στόχους της μεταγραφικής δράσης του HIF-1 είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν με την μορφή SDSA του HIF-1α.

Ακολούθησε η ανάλυση των πρωτεϊνών που ανήκουν στις διεργασίες της οργάνωσης κυτταρικών μεμβρανών και των μικροσωληνίσκων.

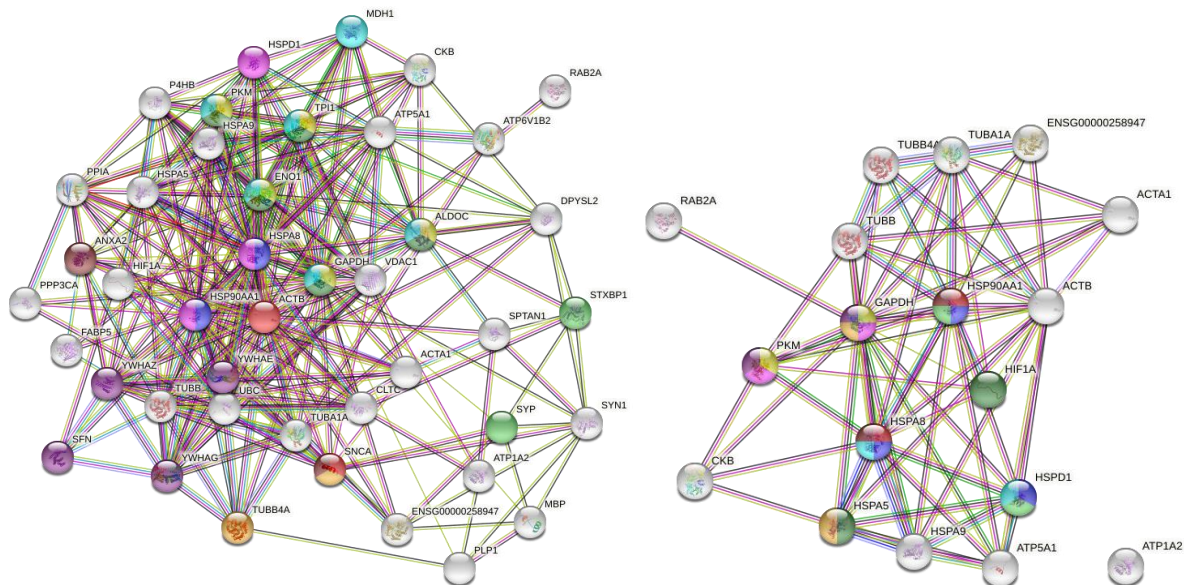


**Εικόνα 17.** Αποτελέσματα String. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από το Gencodis χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά HIF-1α (SDSA) και συμμετέχουν στην: **Αριστερά)** οργάνωση κυτταρικών μεμβρανών **Δεξιά)** οργάνωση μικροσωληνίσκων.



Με βάση την παραπάνω ανάλυση πρωτεΐνες της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών, η ακτίνη, οι τουμπουλίνες α- και β- καθώς και μοριακοί συνοδοί (HSP70) είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν με την μορφή SDSA του HIF-1α.

Τέλος αναλύθηκε η ανάλυση των πρωτεϊνών που ανήκουν σε λειτουργίες αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-νουκλεϊκών οξέων .

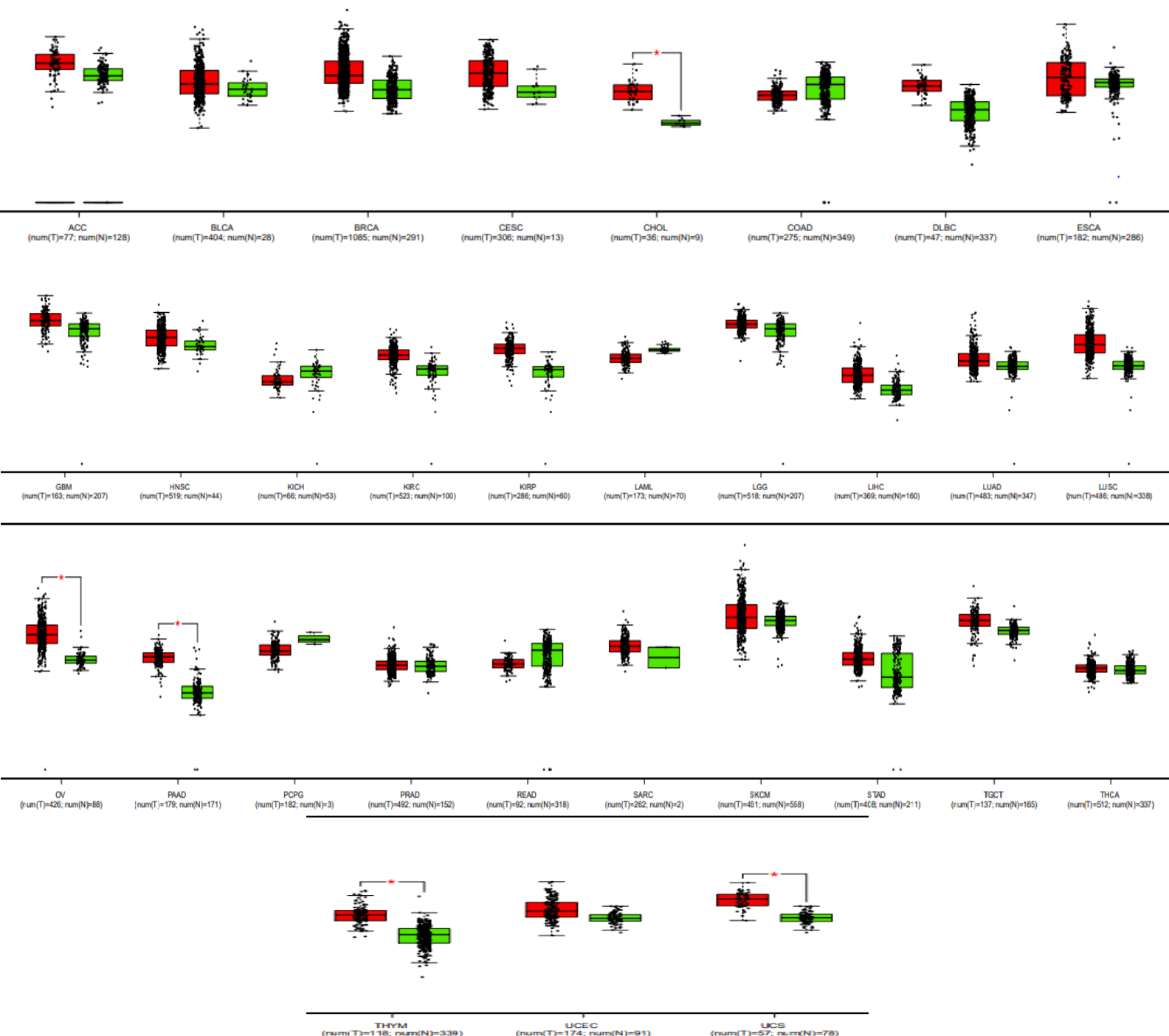


**Εικόνα 18.** Αποτελέσματα *String*. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από το *Gencodis* χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά HIF-1α (SDSA) και συμμετέχουν σε: **Αριστερά)** πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις **Δεξιά)** αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών-νουκλεϊκών οξέων .

Με βάση την παραπάνω ανάλυση οι πρωτεΐνες που είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν με την μορφή SDSA του HIF-1α ανήκουν στην οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών, συναντώνται πρωτεΐνες οργάνωσης του κυτταροσκελετού και των μικροσωληνίσκων όπως η ακτίνη και οι τουμπουλίνες α- και β- καθώς και μοριακοί συνοδοί (αρκετά μέλη της οικογένειας Hsp). Επίσης, έντονη είναι η παρουσία πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων όπως η μορταλίνη (HSPA9), η VDAC1 που έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν σε σύμπλοκο με την μορφή SA του HIF-1α (43).

### **Βιοπληροφορική ανάλυση με το πρόγραμμα Gepia**

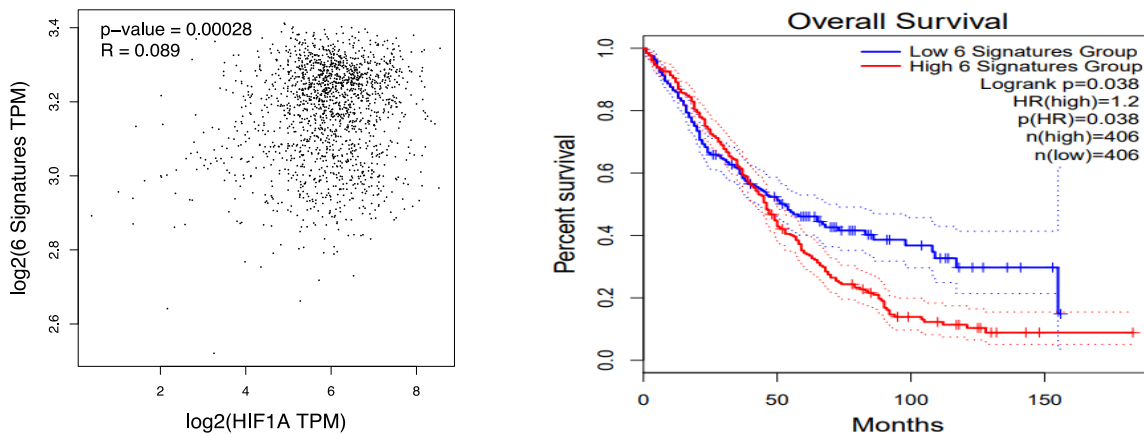
Ακολούθως, χρησιμοποιώντας ως εργαλεία της πλατφόρμας Gepia έγινε σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και ειδικά αυτές που εντοπίζονται στους μικροσωληνίσκους και βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη μορφή SDSA του HIF-1α, μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών σε διάφορους τύπους καρκίνου (**Εικόνα 19**).



**Εικόνα 19. Αποτελέσματα εργαλείου expression DIY του προγράμματος Geria.** Στο σχήμα απεικονίζεται η έκφραση γονιδίων σε διάφορους τύπους καρκίνου (κόκκινο) συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικούς ιστούς (πράσινο). Οι τύποι ιστών στους οποίους εντοπίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών εμφανίζουν κόκκινο αστερίσκο ( $p < 0,05$ ).

Όπως εμφανίζονται στην **εικόνα 19** τα γονίδια που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη μορφή SDSA του HIF-1α από την φασματοσκοπία μάζας βρέθηκε να υπερεκφράζονται σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως το χολαγγειοκαρκίνωμα (Chol), ο καρκίνος των ωθηκών (OV), το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (PAAD), ο καρκίνος του θύμου αδένου (Thym) και ο καρκίνος της μήτρας (UCS). Παράλληλα, λόγω αποτελεσμάτων που αποτελούν μέρος της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος κας Χρ. Αρσένη που δείχνουν ότι η μορφή SDSA του HIF-1α εντοπίζεται σε δυσδιάλυτα κλάσματα κυτταρικών εκχυλισμάτων και μάλιστα σε

υποκυτταρικά στοιχεία που θυμίζουν μικροσωληνίσκους, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης του HIF-1α με πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων. Έτσι στην τελική ανάλυση θελήσαμε να ελέγξουμε την συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1α με την έκφραση των πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη μορφή SDSA του HIF-1α στους 5 τύπους καρκίνου που έχουν σημαντική έκφραση καθώς και την συμβολή τους στην επιβίωση ασθενών. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20** η έκφραση του HIF-1α έχει θετική συσχέτιση με την έκφραση πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν μαζί του. Ενώ, παράλληλα, η υψηλή έκφραση τους συσχετίζεται με αρνητική εξέλιξη της νόσου.



**Εικόνα 20. Αριστερά)** Συσχέτιση της έκφραση HIF-1α με πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων που αλληλεπιδρούν μαζί του. **Δεξιά)** Πρόβλεψη επιβίωσης σε ομάδες ασθενών που εμφανίζουν υψηλά (κόκκινο) ή χαμηλά επίπεδα (μπλε) των πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α.

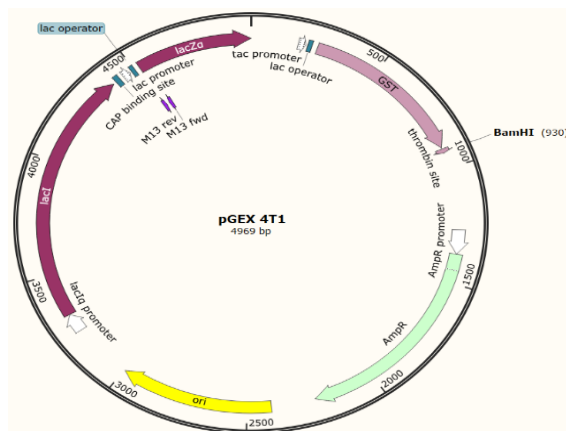
#### 4.2 Πέψη των πλασμιδιακών φορέων pCMV-Flag και pGEX-4T1 με το περιοριστικό ένζυμο BamHI.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο υπάρχουν προκαταρκτικά στοιχεία που δείχνουν αλληλεπίδραση του HIF-1α με πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων και μάλιστα να εμπλέκουν την φωσφορυλίωση από την κινάση CK1δ στην ισχύ της αλληλεπίδρασης. Έτσι για την ευχερέστερη *in vitro* μελέτη των αλληλεπιδράσεων αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί το τμήμα 1-347 του HIF-1α στην αγρίου τύπου μορφή και τις μορφές που αποκλείουν (S247A) ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση (S247D). Έτσι ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση που κωδικοποιεί την αμινοτελικής επικράτειας 1-347 του HIF-1α σε όλες τις παραπάνω μορφές. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν 2 παρασκευαστικές πέψεις. Έτσι, απομονώθηκαν τα ενθέματα για τις αλληλουχίες 1-347 αγρίου τύπου (WT), Ser247->A (SA) και Ser247->D (SD) από τους αντίστοιχους φορείς pCMV-Flag που ήταν κλωνοποιημένα. Κάθε κατηγορία έφερε ενσωματωμένο ένα είδος cDNA (1-347WT, 1-347SA και 1-347SD). Αρχικά μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων στο nanodrop:

- ✓ pGEX4T1 0,5 µg/ml
- ✓ 1-347WT 1,6 µg/µl
- ✓ 1-347SA 1,54 µg/µl

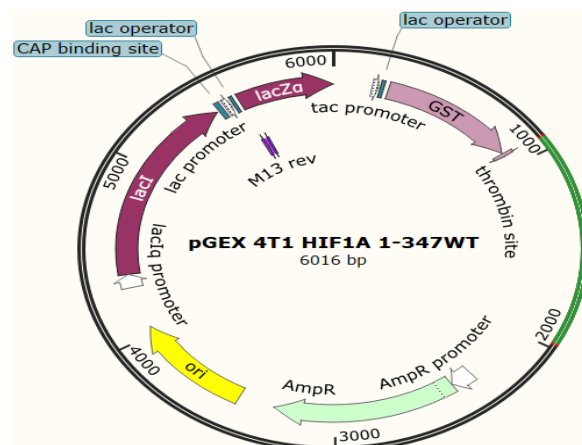
✓ 1-347 SD 1,5 µg/µl

Η πέψη των φορέων έγινε με το ένζυμο περιορισμού BamHI καθώς το τμήμα 1-347 φέρει στα άκρα του θέσεις αναγνώρισης για αυτή την ενδονουκλεάση. Το αποτέλεσμα της πέψης ήταν ένα μονόκλωνο cDNA για το τμήμα 1-347 (1041 bp) και το τμήμα του δίκλωνου ανοικτού φορέα (4679 bp). Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο pGEX-4T1. Ο pGEX-4T1 έχει μέγεθος 4.969bp και μοναδική θέση αναγνώρισης από την ενδονουκλεάση BamHI. Επιπλέον διαθέτει ενσωματωμένη την αλληλουχία κωδικοποίησης για την GST (Τρανσφεράση της γλουταθειόνης) (**Εικόνα 21**). Κατά τη διάρκεια της πέψης προστέθηκε το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (CIP) το οποίο απομακρύνει τις φωσφορικές ομάδες στα άκρα του ανοικτού φορέα ώστε να αποφευχθεί η αυτόματη κυκλοποίηση του. Τα συστατικά και οι ποσότητες των παρασκευαστικών πέψεων που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 7**.



**Εικόνα 21** Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1. Απεικονίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά του φορέα όπως και η θέση αναγνώρισης του ενζύμου BamHI.

Το τελικό αποτέλεσμα προβλέπεται να είναι η δημιουργία πλασμιδίων pGEX-4T1 για καθεμία από τις 3 μορφές της αμινοτελικής επικράτειας 1-347 του HIF-1α (1-347SA, 1-347 SD, 1-347 WT) (**εικόνα 22**).



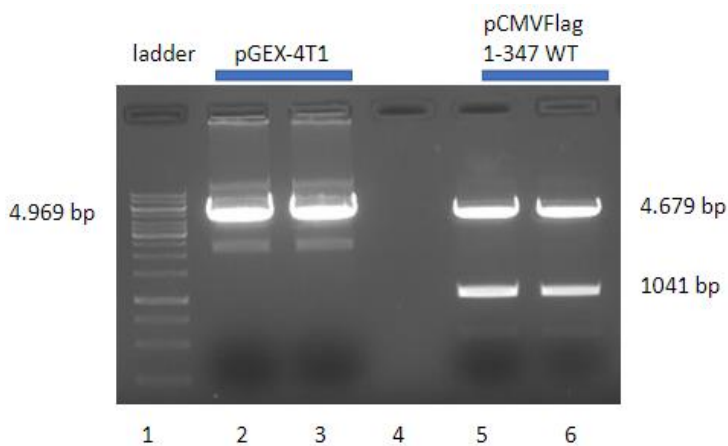
**Εικόνα 22** Σχηματική αναπαράσταση του κλωνοποιημένου με το cDNA HIF-1α-1-347WT πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1. Με πράσινο απεικονίζεται η θέση ενσωμάτωσης.

## Πίνακας 7 Συστατικά και ποσότητες των παρασκευαστικών πέψεων

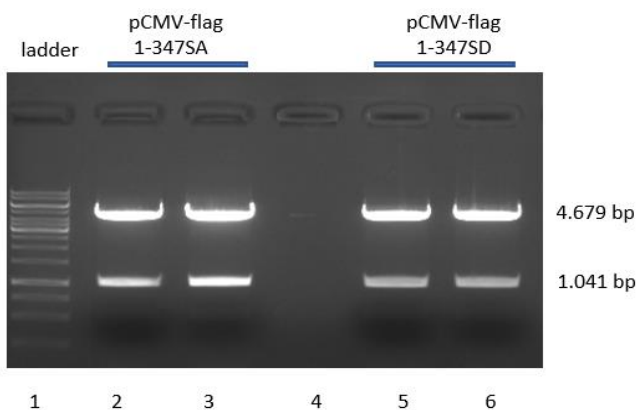
	pCMV-FLAG	pGEX-4T1
Plasmid DNA	3,2 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Buffer10x (cutsmart)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
BamHI	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	40,8 $\mu$ l	34 $\mu$ l

### 4.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για έλεγχο των παρασκευαστικών πέψεων

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μετά την πέψη των φορέων pCMV-Flag 1-347WT, pCMV-Flag 1-347SA, pCMV-Flag 1-347SD και pGEX-4T1 με σκοπό να ελέγξουμε πως έχουν πραγματοποιηθεί σωστά οι πέψεις. Σε κάθε διαδρομή φορτώθηκε ποσότητα δείγματος ίση με 30  $\mu$ l. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πέψεων παρουσιάζονται στην **εικόνα 23** και **εικόνα 24**.



**Εικόνα 23** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης μετά τη πέψη με το ένζυμο BamHI των φορέων pCMV-Flag 1-347WT και pGEX-4T1. Στη 1<sup>η</sup> διαδρομή φορτώθηκε μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στις διαδρομές 2 και 3 η έντονη ζώνη στα 4.969 bp αντιπροσωπεύει τον γραμμικό φορέα pGEX-4T1 και οι διαδρομές 5 και 6 έχουν 2 ζώνες εκ των οποίων η ζώνη στα 4.679 bp ανήκει στον ανοιχτό φορέα pCMV-Flag και η ζώνη στα 1.041 bp στο cDNA 1-347WT.



**Εικόνα 24** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης μετά τη πέψη με το ένζυμο BamHI των φορέων pCMV-Flag 1-347SA και 1-347SD. Στις διαδρομές 2,3,5 και 6 η έντονη ζώνη στα 4.679 bp αντιπροσωπεύει τον γραμμικό φορέα pCMV-Flag. Η ζώνη στα 1.041 bp αντιπροσωπεύει για τις διαδρομές 2 και 3 το cDNA 1-347SA και για τις διαδρομές 5 και 6 το cDNA 1-347SD.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω εικόνων (**εικόνα 23 και εικόνα 24**) επιβεβαίωσαν την επιτυχία των παρασκευαστικών πέψεων ώστε στη συνέχεια να απομονωθούν από την πηκτή τα επιθυμητά τμήματα DNA όπως περιγράφεται στην **παράγραφο 4.4**.

#### **4.4 Απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος.**

Στη συνέχεια ακολουθεί η απομόνωση των γραμμικών DNA από την πηκτή αγαρόζης όπου κόβουμε τις ζώνες της πηκτής αγαρόζης και απομονώνουμε το DNA τόσο του φορέα pGEX-4T1 όσο και του κάθε ενθέματος HIF-1α-1-347 WT/1-347SA/1-327SD με τη βοήθεια κατάλληλου kit απομόνωσης όπως περιγράφεται στην **παράγραφο 3.2.4**. Οι συγκεντρώσεις των 4 δειγμάτων μετρούνται στη συσκευή nanodrop. Οι συγκεντρώσεις αναγράφονται στον **πίνακα 8** :

**Πίνακας 8 Απομονωμένα τμήματα DNA και οι συγκεντρώσεις τους μετά από Gel extraction που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του nanodrop**

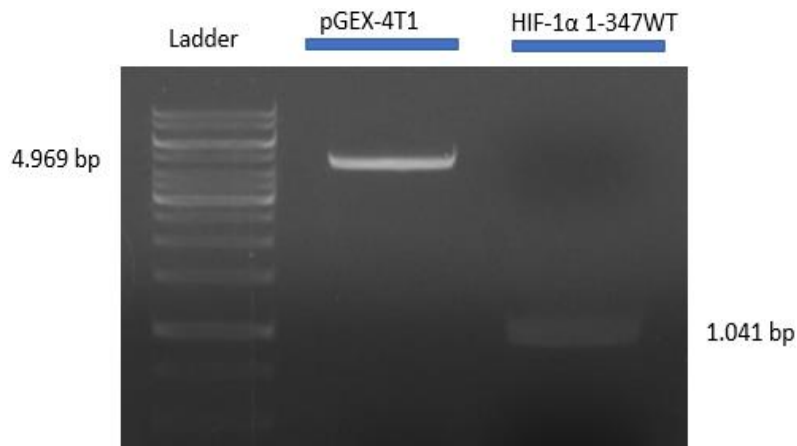
<b>Τμήμα απομονωμένου DNA</b>	<b>Συγκέντρωση (ng/μl)</b>
pGEX-4T1	106 ng/μl
1-347WT	16,5 ng/μl
1-347SA	22,2 ng/μl
1-347SD	13,1 ng/μl

#### **4.5 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων με σκοπό τον έλεγχο καθαρισμού**

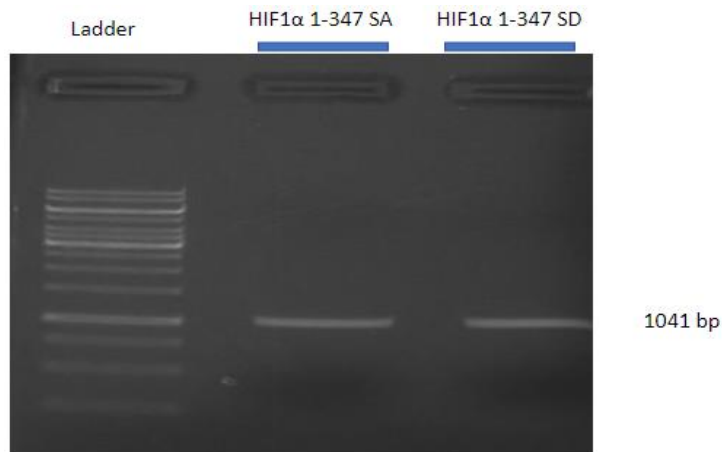
Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα με σκοπό τον έλεγχο της απομόνωσης από την πηκτή αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκαν 2 ηλεκτροφορήσεις. Στην πρώτη (**εικόνα 25**) έγινε έλεγχος της απομόνωσης του ανοιχτού πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1 και του ενθέματος cDNA 1-347WT και στην δεύτερη (**εικόνα 26**) των ενθεμάτων cDNA 1-347SD και cDNA 1-347SA. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται παρακάτω :

<b>Τελικός όγκος(Vτελ= 12 μl)</b>	<b>pGEX-4T1</b>	<b>1-347 WT/SA/SD</b>
DNA	1 μl	2 μl
H2O	9 μl	8 μl
LB	2 μl	2 μl

Σε κάθε διαδρομή φορτώθηκαν 3 μl .



**Εικόνα 25** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης του καθαρισμού του φορέα *pGEX-4T1* και του *cDNA 1-347WT*. Η ζώνη στα 4.969 bp αντιστοιχεί στον γραμμικό πλασμιδιακό φορέα *pGEX-4T1* και η ζώνη στα 1.041 bp αντιστοιχεί στο ένθεμα *cDNA 1-347WT*.



**Εικόνα 26** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης του καθαρισμού των ενθεμάτων *cDNA 1-347SA* και *cDNA 1-347SD*. Η ζώνη στα 1.041bp αντιστοιχεί στα ενθέματα *cDNA 1-347SA* και *1-347SD*.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες ο καθαρισμός ήταν επιτυχής καθώς παρατηρήθηκε μία ζώνη σε κάθε διαδρομή που αντιστοιχούσε στο απομονωμένο κομμάτι DNA.

#### 4.6 Αντίδραση DNA λιγάσης T4 και κλωνοποίηση ενθεμάτων σε φορείς *pGEX - 4T1*

Στην αντίδραση λιγάσης που ακολούθησε η μοριακή αναλογία μεταξύ ενθέματος και γραμμικού πλασμιδίου ήταν 5:1. Με τη βοήθεια του [Nebio-calculator](https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation) (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) υπολογίζονται οι ποσότητες φορέα και ενθέματος στην επιθυμητή αναλογία. Για 50 ng (C= 106 ng /μl, βλ. **πίνακα 8**) φορέα *pGEX-4T1* οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον **πίνακα 9**.

Πίνακας 9 Α) Ποσότητες φορέα και ενθέματος υπολογισμένες με το βιοπληροφορικό εργαλείο Nebiocalculator. Β) Συστατικά και ποσότητες της αντίδρασης λιγάσης

Α)

DNA	Ποσότητα (ng)
pGEX-4T1	50 ng
1-347SA	52,37 ng
1-347WT	52,37 ng
1-347SD	52,37 ng

Β)

Συστατικά αντίδρασης λιγάσης	Όγκος (V <sub>τελ</sub> = 20μl)
H <sub>2</sub> O	13,36 μl
Buffer (Cutsmart)	2 μl
Φορέας (Vector)	0,47 μl
Ένθεμα (insert)	3,17 μl
T4 ligase	1 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται στο θερμικό κυκλοποιητή στους 16°C για 16h. Έτσι δημιουργήθηκαν ανασυνδιασμένοι φορείς pGEX-4T1 3 τύπων: pGEX-4T1-1-347WT, pGEX-4T1-1-347SA και pGEX-4T1-1-347SD.

#### 4.7 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli με πλασμιδιακούς φορείς και δημιουργία αποικιών σε τρυβλίο petri

Χρησιμοποιήθηκαν 100 μl δεκτικά Top10 E.coli βακτήρια στα οποία έγινε προσθήκη 20 μl για καθένα από τα προϊόντα που είχαν προκύψει μετά από την αντίδραση λιγάσης. Στη συνέχεια ακολούθησε θερμικό σοκ με σκοπό την είσοδο του πλασμιδίου. Τέλος, έγινε επίστρωση τους σε στερεή καλλιέργεια σε τρυβλία petri και overnight (16h) επώαση για ανάπτυξη των αποικιών. Τα τρυβλία διέθεταν το αντιβιοτικό (Amp) στο οποίο έφερε αντίσταση ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1 ώστε να αναπτυχθούν εκλεκτικά μόνο τα μετασηματισμένα βακτήρια δίνοντας τις αντίστοιχες αποικίες.

#### 4.8 Ανάπτυξη βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας

Για το σκοπό αυτό σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκε τόσο το κατάλληλο αντιβιοτικό όσο και το θρεπτικό υλικό LB όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6. Επιλέχθηκαν 10 πιθανές αποικίες μετασηματισμένων βακτηρίων από κάθε τρυβλίο petri οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε κάθε δοκιμαστικό ενοφθαλμίστηκε μια αποικία. Έτσι την επόμενη μέρα είχαν αναπτυχθεί 10 καλλιέργειες των 10 επιλεγμένων αποικιών για το κάθε ένθεμα.



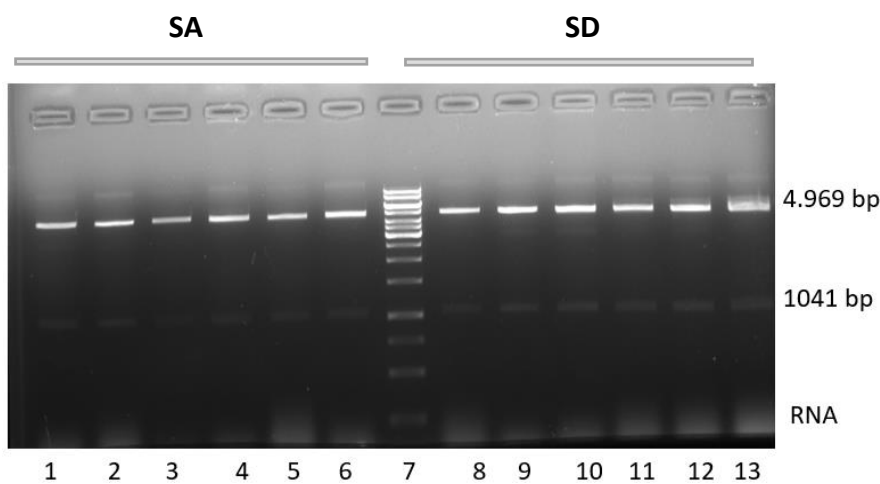
#### 4.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 3.2.7 το πλασμιδιακό DNA από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια απομονώθηκε από καθεμία από τις 10 βακτηριακές καλλιέργειες με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Στη συνέχεια ακολούθησε πέψη και ηλεκτροφόρηση για να βρεθούν οι καλλιέργειες των μετασχηματισμένων με το κατάλληλο πλασμίδιο βακτηρίων .

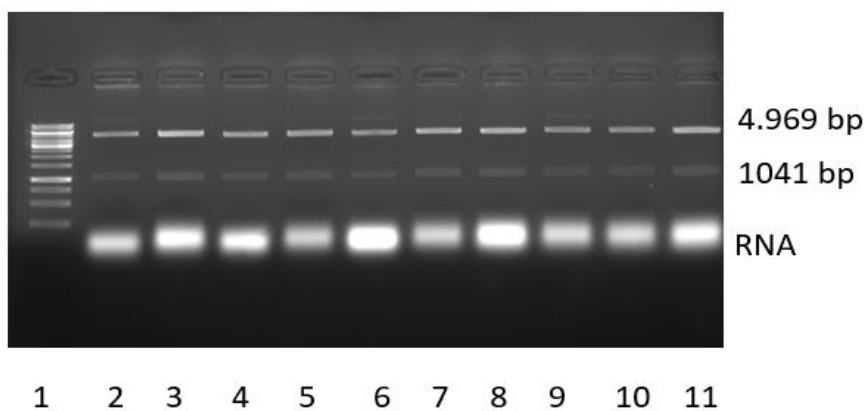
#### 4.10 Πέψη και ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA βακτηριακών αποικιών

##### Πέψη ελέγχου για επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης.



**Εικόνα 28 Ηλεκτροφόρηση πέψης ελέγχου για επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών.** Έλεγχος για εισαγωγή του ενθέματος μετά από πέψη του πλασμιδίου *pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)* SA (διαδρομές 1-6) και του πλασμιδίου *pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)* SD (διαδρομές 8-13) σε 6 βακτηριακές αποικίες για την κάθε κατασκευή.

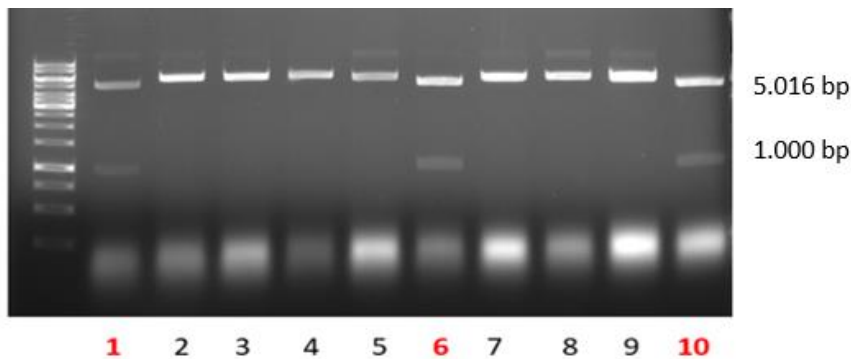


**Εικόνα 29 Ηλεκτροφόρηση πέψης ελέγχου για επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών.** Έλεγχος για εισαγωγή του ενθέματος μετά από πέψη του πλασμιδίου *pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)* WT σε 10 βακτηριακές αποικίες.

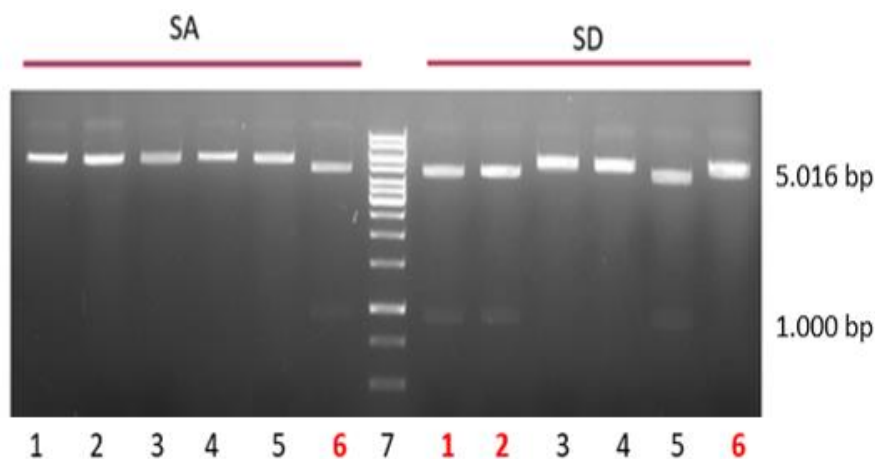
Στις απεικονίσεις των 2 ηλεκτροφορήσεων η κάτω ζώνη αντιστοιχεί στο RNA ενώ η πάνω στο φορέα pGEX-4T1 (4.969 bp). Το ένθεμα βρίσκεται στα 1.041 bp. Παρατηρήθηκε ότι το ένθεμα το έχουν προσλάβει όλες οι αποικίες που επιλέχθηκαν τόσο για το 1-347SA (εικόνα 28: διαδρομές 1-6 ) όσο και για το 1-347SD (εικόνα 28: διαδρομές 8-13) και το 1-347WT (εικόνα 29: διαδρομή 2-11).

### Πέψη για έλεγχο προσανατολισμού ενθέματος

Το πείραμα συνεχίστηκε με μία ακόμη πέψη με την οποία έγινε έλεγχος του προσανατολισμού του ενθέματος με το ένζυμο XhoI μετά από πέψη που πραγματοποιήθηκε στο απομονωμένο DNA από κάθε επιλεγμένη μετασχηματισμένη με τις κατασκευές αποικία. Για τις κατασκευές pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)WT επιλέχθηκαν και οι 10 μετασχηματισμένες αποικίες και για καθεμιά από τις κατασκευές pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)SD και pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)SA επιλέχθηκαν 6 αποικίες. Ο σωστός προσανατολισμός του ενθέματος στους πλασμιδιακούς φορείς επιτρέπει τον σχηματισμό του επιθυμητού πρωτεϊνικού τμήματος μετά από επαγωγή μεταγραφής του. Τα προϊόντα κάθε πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (εικόνα 30 και 31).



**Εικόνα 30** Πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI των πλασμιδίων pGEX-4T1-1-347WT των 10 μετασχηματισμένων βακτηριακών καλλιέργειών E.Coli. Με κόκκινο επισημαίνονται οι καλλιέργειες που έχουν λάβει με σωστό προσανατολισμό το ένθεμα. Η πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI βάση του πλασμιδιακού χάρτη δίνει τμήματα 1000bp και 5016 bp αν το ένθεμα έχει εισαχθεί με το σωστό προσανατολισμό στο φορέα.



**Εικόνα 31** Πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI των πλασμιδιακών φορέων pGEX-4T1-1-347SA και pGEX-4T1-1-347SD των 6 για κάθε κατασκευή μετασχηματισμένων βακτηριακών

**καλλιιεργειών E.Coli.** Με κόκκινο επισημαίνονται οι καλλιιεργειες που έχουν λάβει με σωστό προσανατολισμό το ένθεμα. Η πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI βάση του πλασμιδιακού χάρτη δίνει τμήματα 1000bp και 5016 bp αν το ένθεμα έχει εισαχθεί με το σωστό προσανατολισμό στο φορέα.

Στα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων παρατηρήθηκε πως για την κατασκευή pGEX-4T1-HIF-1α(1-347) WT το ένθεμα το έχουν προσλάβει με σωστό προσανατολισμό οι καλλιιεργειες 1,6 και 10, όπως φαίνεται στην **εικόνα 30**. Παράλληλα στην ηλεκτροφόρηση για τις κατασκευές pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)SA και pGEX-4T1-HIF-1α(1-347)SD παρατηρήθηκε πως το ένθεμα το έχουν προσλάβει με σωστό προσανατολισμό η 6 και η 1,2,6 αντίστοιχα. Η επιλογή καλλιιεργειών οι οποίες είχαν προκύψει από αποικίες σωστά μετασηματισμένων πλασμιδίων με το κατάλληλο προσανατολισμό ενθέματος έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας καθαρών υγρών βακτηριακών καλλιιεργειών από τις οποίες στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA όπως περιγράφεται παρακάτω .

#### **4.11 Δημιουργία καθαρού πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιιεργειες**

Μετά την επιλογή καλλιιεργειών που είχαν προσλάβει το ένθεμα με σωστό προσανατολισμό δημιουργήθηκαν υγρές βακτηριακές καλλιιεργειες μικρής κλίμακας χρησιμοποιώντας μία αποικία για κάθε κατασκευή. Η ανάπτυξη έγινε σε LB με προσθήκη του αντιβιοτικού Amp και ολονύκτια (overnight) επώαση στους 37 °C στις 170 rpm (βλ. **παράγραφο 3.2.6**)

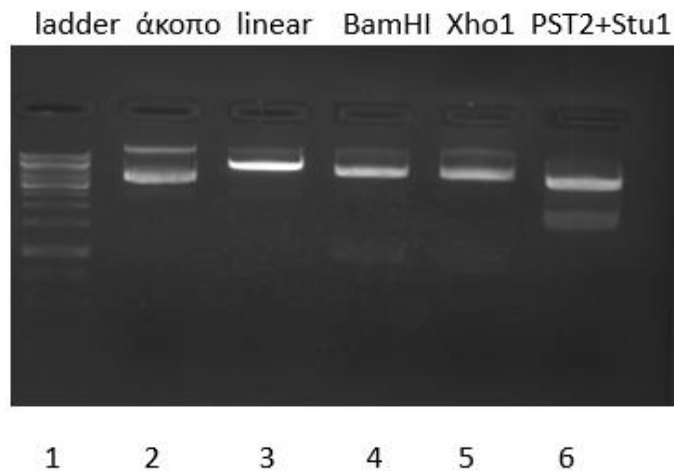
#### **4.12 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρές βακτηριακές καλλιιεργειες με το “Plasmid Mini kit”**

Την επόμενη μέρα, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από κάθε μία από τις υγρές βακτηριακές καλλιιεργειες με το kit της εταιρίας Bioline (“Plasmid Mini kit”) όπως περιγράφεται στην **παράγραφο 3.2.7**.

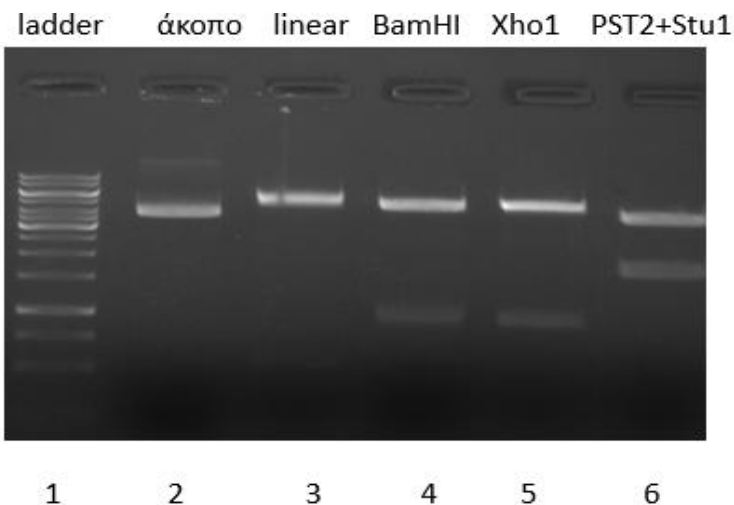
Στη συνέχεια ακολούθησαν δοκιμαστικές πέψεις και ηλεκτροφόρηση για να διαπιστωθεί σε ποιες από τις καλλιιεργειες έγινε σωστά η ενσωμάτωση του cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Η επιλογή των περιοριστικών ενζύμων έγινε μετά από μελέτη του πλασμιδιακού χάρτη. Έτσι, ακολούθησαν 4 δοκιμαστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII, BamHI, XhoI και PSTI με StuI. Η διπλή πέψη εφαρμόστηκε για να ελεγχθεί η ακριβής ενσωμάτωση του ενθέματος. Παρακάτω παρουσιάζονται τα επιθυμητά τμήματα μετά από κάθε πέψη.

<b>Ένζυμο περιορισμού</b>	<b>Τμήματα DNA μετά από πέψη</b>
<b>PST2 και Stu1</b>	4152 bp/1864 bp
<b>BamHI</b>	4969 bp/1041 bp
<b>Hindi</b>	6.016 bp
<b>Xho1</b>	5016 bp/ 1000 bp

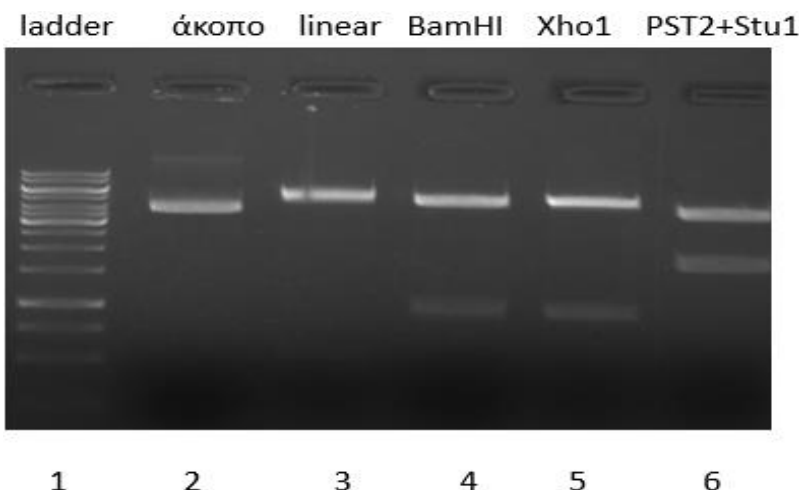
Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:



**Εικόνα 32** Δοκιμαστικές πέψεις πλασμιδιακού φορέα *pGEX-4T1-1-347SA* με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII*, *BamHI*, *XhoI* και *PST2* με *StuI*. Ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας *pGEX-4T1* (διαδρομή 2) βρίσκεται στα 4.969 bp. Οι δυο ζώνες αντιστοιχούν στην κυκλική μορφή (πάνω ζώνη) και στην υπερελικωμένη (κάτω ζώνη). Στη διαδρομή 3 βρίσκεται ο γραμμικός πλασμιδιακός φορέας μετά από πέψη με το ένζυμο *HindIII* (6.016bp). Στη διαδρομή 4 έχει γίνει πέψη με το ένζυμο *BamHI*. Στο πήκτωμα υπάρχουν 2 ζώνες. Η πάνω αντιστοιχεί στον ανοιχτό φορέα στα 4.969 bp και η κάτω στα 1.041 bp και αντιστοιχεί στο τμήμα *cDNA1-347SA*. Η διαδρομή 4 αντιστοιχεί σε πέψη με το ένζυμο *XhoI* που επιβεβαιώνει τον προσανατολισμό (5016 bp/ 1000 bp) και η διαδρομή 5 αντιστοιχεί σε διπλή πέψη με τα ένζυμα *PST2* και *StuI* (4152 bp/1864 bp).



**Εικόνα 33** Δοκιμαστικές πέψεις πλασμιδιακού φορέα *pGEX-4T1-1-347SD* με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII*, *BamHI*, *XhoI* και *PST2* με *StuI*. Ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας *pGEX-4T1* (διαδρομή 2) βρίσκεται στα 4.969 bp. Οι δυο ζώνες αντιστοιχούν στην κυκλική μορφή (πάνω ζώνη) και στην υπερελικωμένη (κάτω ζώνη). Στη διαδρομή 3 βρίσκεται ο γραμμικός πλασμιδιακός φορέας μετά από πέψη με το ένζυμο *HindIII* (6.016bp). Στη διαδρομή 4 έχει γίνει πέψη με το ένζυμο *BamHI*. Στο πήκτωμα υπάρχουν 2 ζώνες. Η πάνω αντιστοιχεί στον ανοιχτό φορέα στα 4.969 bp και η κάτω στα 1.041 bp και αντιστοιχεί στο τμήμα *cDNA1-347SD*. Η διαδρομή 4 αντιστοιχεί σε πέψη με το ένζυμο *XhoI* (5016 bp/ 1000 bp) που επιβεβαιώνει τον προσανατολισμό και η διαδρομή 5 αντιστοιχεί σε διπλή πέψη με τα ένζυμα *PST2* και *StuI* (4152 bp/1864 bp).



**Εικόνα 34** Δοκιμαστικές πέψεις πλασμιδιακού φορέα *pGEX-4T1-1-347WT* με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII*, *BamHI*, *XhoI* και *PST2* με *StuI*. Ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας *pGEX-4T1* (διαδρομή 2) βρίσκεται στα 4.969 bp. Οι δυο ζώνες αντιστοιχούν στην κυκλική μορφή (πάνω ζώνη) και στην υπερελικωμένη (κάτω ζώνη). Στη διαδρομή 3 βρίσκεται ο γραμμικός πλασμιδιακός φορέας μετά από πέψη με το ένζυμο *HindIII* (6.016bp). Στη διαδρομή 4 έχει γίνει πέψη με το ένζυμο *BamHI*. Στο πήκτωμα υπάρχουν 2 ζώνες. Η πάνω αντιστοιχεί στον ανοιχτό φορέα στα 4.969 bp και η κάτω στα 1.041 bp και αντιστοιχεί στο τμήμα *cDNA1-347WT*. Η διαδρομή 4 αντιστοιχεί σε πέψη με το ένζυμο *XhoI* (5016 bp/ 1000 bp) που επιβεβαιώνει τον προσανατολισμό και η διαδρομή 5 αντιστοιχεί σε διπλή πέψη με τα ένζυμα *PST2* και *StuI* (4152 bp/1864 bp)..

Οι παραπάνω πέψεις επιβεβαίωσαν την απομόνωση κατάλληλα ανασυνδιασμένου πλασμιδίου ο οποίος χρησιμοποιήθηκε σε επόμενα πειράματα για το μετασχηματισμό της βακτηριακής σειράς BL21RIL.

#### **4.13 Μετασχηματισμός της βακτηριακής σειράς BL21RIL με τις πλασμιδιακές κατασκευές και δημιουργία υγρών καλλιεργειών μικρής κλίμακας**

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21RIL με τις πλασμιδιακές κατασκευές *pGEX-4T1-1-347WT*, *pGEX-4T1-1-347SA*, *pGEX-4T1-1-347SD*, που απομονώθηκαν σε προηγούμενα βήματα από τη βακτηριακή σειρά TOP 10, καθώς και με τον μη ανασυνδιασμένο πλασμιδιακό φορέα *pGEX-4T1*. Η διαδικασία του μετασχηματισμού περιγράφεται στην **παράγραφο 3.2.5**. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 100 μl BL21RIL βακτήρια στα οποία έγινε προσθήκη 20 μl για καθένα από τα προϊόντα που είχαν προκύψει μετά της απομόνωση και το καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA.

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Amp) ως δείκτη επιλογής των βακτηρίων που προσέλαβαν την εκάστοτε πλασμιδιακή κατασκευή και το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη για την επιλογή βακτηρίων με τα κατάλληλα πλασμίδια για τα tRNA που παράλληλα φέρουν αντίσταση στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ολονύκτια (overnight) επώαση 16h υπό ανάδευση.

Την επόμενη μέρα συλλέχθηκαν 3-4 αποικίες από κάθε ένα από τα 4 τρυβλία και ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB με το αντιβιοτικό χλωραφαινικόλη. Ακολουθεί ολονύκτια (overnight) επώαση 16h στους 37°C στα 170 rpm υπό συνεχή ανάδευση.

#### 4.14 Δημιουργία υγρών βακτηριακών καλλιέργειών μεσαίας κλίμακας και επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης με IPTG

Όπως περιγράφηκε στην **παράγραφο 3.2.8** μετά τη δημιουργία υγρών καλλιέργειών μεσαίας κλίμακας βακτηριακών κυττάρων BL21RIL έγινε επαγωγή των χιμαιρικών με GST πρωτεϊνών που κωδικοποιούν για την αμινοτελική (1-347) επικράτεια του HIF-1α σε όλες τις μορφές της. Τα κύτταρα μετά την επαγωγή συλλέχθηκαν και διατηρήθηκαν στους -20°C.

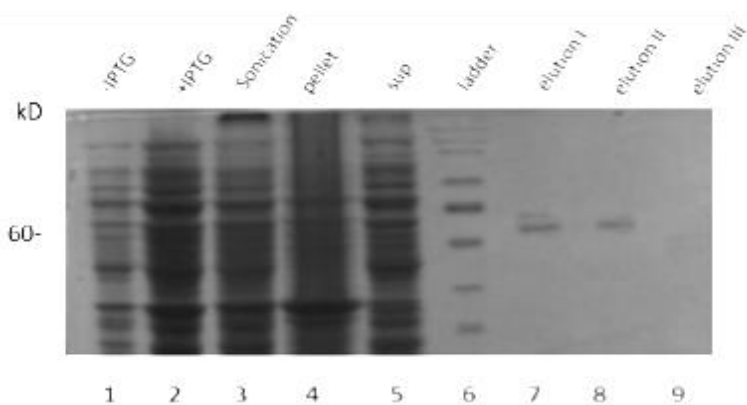
#### 4.15 Απομόνωση-Καθαρισμός πρωτεϊνών

Την επόμενη μέρα επαναιωρήθηκε το ίζημα κυττάρων σε κατάλληλο διάλυμα (βλ. **παράγραφο 3.2.9**) ώστε τα βακτήρια να είναι καλά αιωρημένα. Τα δείγματα των κυττάρων συλλέχθηκαν και λύθηκε η κυτταρική τους μεμβράνη με τη βοήθεια υπερήχων (sonication). Ακολούθησε φυγοκέντριση και λήφθηκαν δείγματα τόσο από το υπερκείμενο (sup) όσο και από το ίζημα κυττάρων (pellet). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης των πρωτεϊνών, όπως παρουσιάζεται στην **παράγραφο 3.2.9** μετρήθηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών του κάθε δείγματος με τη μέθοδο Bradford. Πιο συγκεκριμένα, από τις απορροφήσεις του φασματοφωτόμετρου και βάση τη πρότυπη καμπύλη υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των 3ων εκλούσεων για κάθε ένα από τα απομονωμένα πρωτεϊνικά τμήματα του HIF-1α που παρουσιάζονται στον **πίνακα 10**.

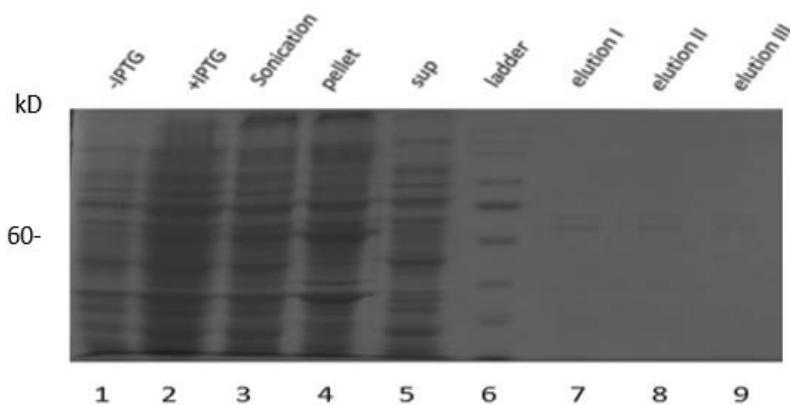
**Πίνακας 10 Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών τμημάτων HIF-1α (1-347) μετά από τον καθαρισμό τους**

Χιμαιρική πρωτεΐνη	Συγκέντρωση (μg/ μl)
GST-HIF-1α-1-347WT	0,1
GST-HIF-1α-1-347S247A	0,1
GST-HIF-1α-1-347S247D	1

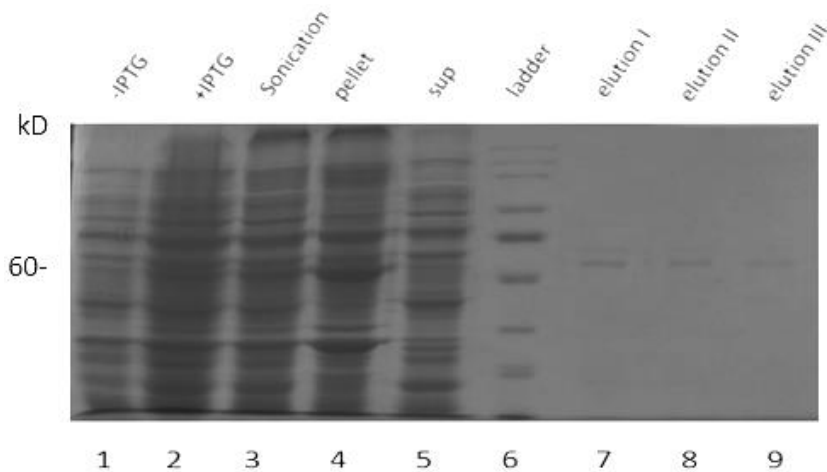
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με δείγματα τα οποία είχαν συλλεχθεί σε όλη τη διάρκεια καθαρισμού των πρωτεϊνικών τμημάτων προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απομόνωση των πρωτεϊνικών τμημάτων. Σε κάθε διαδρομή φορτώνουμε για κάθε δείγμα των διαδρομών 1-5 60 μl και από κάθε έκλουση 20 μl. Στη διαδρομή 6 φορτώθηκε μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στις **εικόνες 35,36 και 37**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης :



**Εικόνα 35.** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με σκοπό τον έλεγχο καθαρισμού του πρωτεϊνικού τμήματος *GST-HIF-1α-1-347WT* της αμινοτελικής επικράτειας του *HIF-1α* μετά από υπερέκφραση. Στα 60 kD εντοπίζεται το πρωτεϊνικό τμήμα του *GST-HIF-1α-1-347WT* το οποίο όπως παρατηρείται εμφανίζει έντονη ζώνη κυρίως στην 1<sup>η</sup> έκλουση (διαδρομή 7).



**Εικόνα 36:** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με σκοπό τον έλεγχο καθαρισμού του πρωτεϊνικού τμήματος *GST-HIF-1α-1-347SA* της αμινοτελικής επικράτειας του *HIF-1α* μετά από υπερέκφραση. Στα 60 kD εντοπίζεται το πρωτεϊνικό τμήμα του *GST-HIF-1α-1-347SA* το οποίο όπως παρατηρείται εμφανίζει έντονη ζώνη κυρίως στην 1<sup>η</sup> έκλουση (διαδρομή 7).



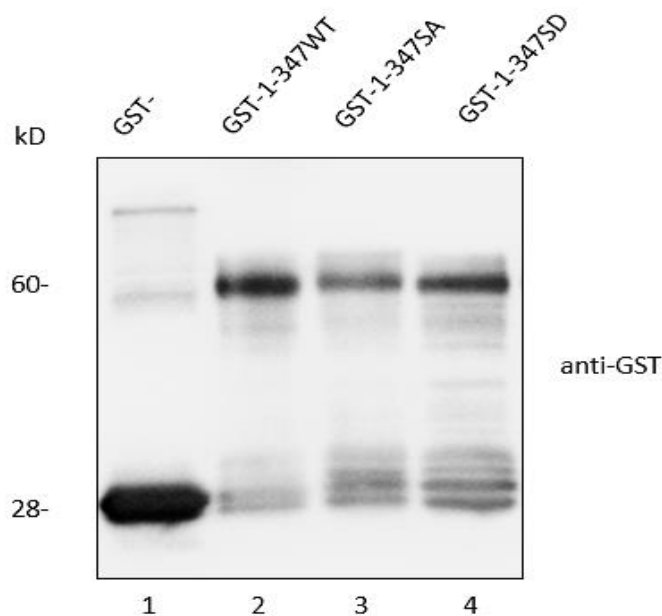
**Εικόνα 37:** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με σκοπό τον έλεγχο καθαρισμού του πρωτεϊνικού τμήματος *GST-HIF-1α-1-347SD* της αμινοτελικής επικράτειας του *HIF-1α* μετά από υπερέκφραση. Στα 60 kD εντοπίζεται το πρωτεϊνικό τμήμα του *GST-HIF-1α-1-347SD* το οποίο όπως παρατηρείται εμφανίζει έντονη ζώνη κυρίως στην 1<sup>η</sup> έκλουση (διαδρομή 7).

Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων επιβεβαίωσαν τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Έτσι, επιτεύχθηκε η απομόνωση των τριών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *GST-HIF-1α 1-347* (σε όλες τις μορφές) με συγκέντρωση που εμφανίζεται στον **πίνακα 10** τα οποία περιείχαν το καθένα το εκχύλισμα των 3 εκλούσεων για κάθε χημειοκατασκευασμένη πρωτεΐνη.

#### 4.16 Επιβεβαίωση ταυτότητας καθαρισμένων πρωτεϊνών τμημάτων του *HIF-1α*

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) προκειμένου να εξακριβωθεί περαιτέρω η επιτυχία καθαρισμού των πρωτεϊνών. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην **παράγραφο 3.2.14**. Η ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώθηκε σε κάθε διαδρομή υπολογίστηκε στην αντίδραση Bradford (βλ. **παράγραφο 3.2.10**) ώστε να έχει κάθε δείγμα 1 μg πρωτεΐνης (βλ. **παράγραφο 4.14**). Ως πρωτεύων αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε anti-GST αντίσωμα το οποίο θα αναγνωρίζει τον επίτοπο GST της κάθε απομονωμένης χημειοκατασκευασμένης πρωτεΐνης *GST-HIF-1α-1-347*. Το δευτερεύων αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν anti-mouse αντίσωμα σε σύντηξη με υπεροξειδάση. Για τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και τις αραιώσεις βλέπε **παράγραφο 3.1.6**. Μετά το πέρας επώασης της μεμβράνης με το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα ακολούθησε αντίδραση χημειοφωταύγειας και ανάπτυξη της φωτογραφίας (**εικόνα 38**).





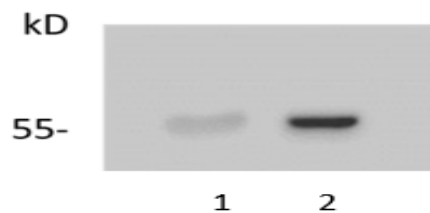
**Εικόνα 38 :** Ανοσοαποτύπωση (*Western blotting*) των διαφορετικών μορφών του *GST-HIF-1α 1-347* μετά τον καθαρισμό τους από βακτηριακές καλλιέργειες. Η ζώνη στα 28 kD αντιστοιχεί στην καθαρή πρωτεΐνη *GST* ενώ η ζώνη στα 60 kD αντιστοιχεί το πρωτεϊνικό τμήμα *HIF-1α 1-347* σε σύντηξη με την *GST*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την επιτυχία καθαρισμού των πρωτεϊνικών τμημάτων, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συγκατακρήμισης με εκχυλίσματα πλούσια σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων για να ελεγχθεί *in vitro* η αλληλεπίδραση τους.

#### 4.17 Απομόνωση εκχυλισμάτων εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων HeLa με σκοπό την απομόνωση εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων και δοκιμή πολυμερισμού τους με την ουσία paclitaxel. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην **παράγραφο 3.2.15**. Μετά το πέρας της απομόνωσης μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (βλ. **παράγραφο 3.2.10**) και υπολογίστηκε η συγκέντρωση των απομονωμένων πρωτεϊνών, η οποία υπολογίστηκε 1,4 μg/μl.

Κατά την παρασκευή κρατήθηκε δείγμα εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa πριν και μετά τον πολυμερισμό με ταξόλη (paclitaxel) των μικροσωληνίσκων και ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western η παρουσία της τουμπουλίνης σε αυτά (**εικόνα 39**).



**Εικόνα 39** Ανοσοαποτύπωση (*Western blotting*) της πρωτεΐνης τουμπουλίνης κατά τη διαδικασία εκχύλισης πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων. **A)** Παρουσία της τομπουλίνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα απουσία ταξόλης. **B)** Παρουσία της τομπουλίνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα μετά την επώαση με ταξόλη.

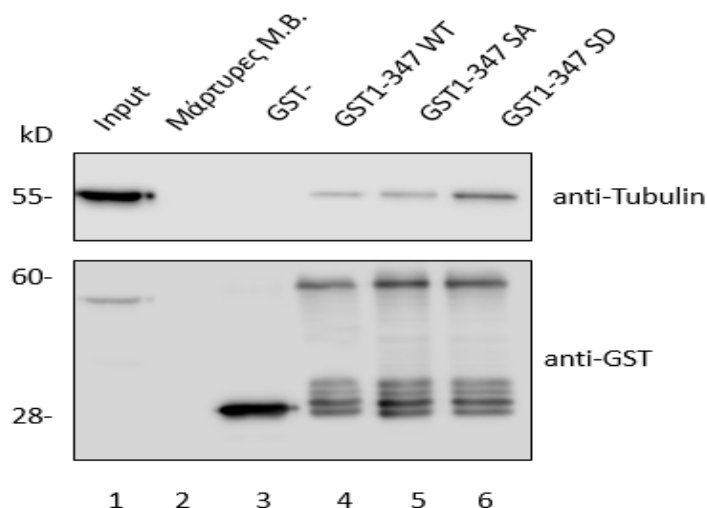
Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανοσοαποτύπωσης επιβεβαίωσαν την απομόνωση πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων αλλά και την ικανότητα πολυμερισμού και ρύθμισης της δυναμικής αστάθειας των μικροσωληνίσκων από την ταξόλη. Έτσι πλέον, είχαν απομονωθεί τόσο τα πρωτεϊνικά τμήματα της αμινοτελικής επικράτειας του HIF-1α όσο και εκχυλίσματα πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων δίνοντας την δυνατότητα ελέγχου της αλληλεπίδρασης τους *in vitro*. Επίσης η δυνατότητα πολυμερισμού *in vitro* με ταξόλη δύναται να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά πειράματα *in vitro* ανασύστασης μικροσωληνίσκων παρουσία τμημάτων του HIF-1α για τη διαλεύκανση του ρόλου του εντοπισμού του HIF-1α στις δομές αυτές.

#### **4.18 In vitro δοκιμή συγκατακρήμνισης με τις διαφορετικές μορφές του GST-HIF-1α 1-347 (Pull-down assays)**

Προκειμένου να γίνει ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης του αμινοτελικού άκρου του HIF-1α με πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαροζης (GSH-sepharose). Έτσι, αφού καθηλωθούν τα πρωτεϊνικά τμήματα GST, GST-HIF-1α 1-347WT, GST-HIF-1α 1-347SA και GST-HIF-1α 1-347SD να δημιουργηθούν στήλες-δολώματα για τις πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων από τα κύτταρα HeLa. Μετά από την πλύση σφαιριδίων με το κατάλληλο buffer (βλ. **παράγραφο 3.2.14**) δεσμεύτηκαν τα δολώματα στη στήλη με επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 4 °C.

Σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών τμημάτων που συνοψίζονται στον **πίνακα 10** κατά τη διαδικασία πρόσδεσης τους στα σφαιρίδια προστέθηκε αντίστοιχος όγκος ώστε να αντιστοιχεί σε ~10 μg καθαρής πρωτεΐνης. Ακολούθησε pull-down (συγκατακρήμνιση) με προσθήκη 250 μl διαλύματος εκχυλίσματος πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων (~ 350 μg) στις στήλες υπό ανάδευση στους 4 °C για 16 h. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο οι κατακρημνισμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν καθώς προστέθηκε διάλυμα περίσσειας γλουταθειόνης (βλ. **παράγραφο 3.2.14**).

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων από τις εκλούσεις σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα anti-Tubulin και anti-GST (**εικόνα 40**).



**Εικόνα 40** Ανοσοαποτύπωση (*Western blotting*) μετά από πείραμα συγκατακρήμνισης των διαφόρων μορφών GST-HIF-1α 1-347 με εκχυλίσματα από κύτταρα *HeLa* που περιέχουν πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων. Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν *anti-GST* (κάτω) και *anti-Tubulin* (πάνω). Στις διαδρομές 4,5,6 παρατηρείται η συγκατακρήμνιση της τουμπουλίνης από τις 3 ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Η ζώνη στα 60 kD αντιστοιχεί στις διαφορετικές μορφές GST-HIF-1α 1-347 (όπως αναγράφονται) τα οποία ανιχνεύθηκαν με αντίσωμα *anti-GST*. Στα 28 kD εντοπίζεται η πρωτεΐνη GST ενώ στα 55 kD η τουμπουλίνη.

Το παραπάνω πείραμα συγκατακρήμνισης ότι η αμινοτελική επικράτεια 1-347 του HIF-1α είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με την τουμπουλίνη (ενώ η GST όχι) και ειδικότερα η μεταλλαγμένη μορφή του τμήματος 1-347 SD που μιμείται τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την τουμπουλίνη.

## 5.Συζήτηση

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία) αναπόσπαστο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ομοιοστασίας έχουν οι επαγόμενοι από υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF. Η επαγωγή των παραγόντων HIF καθοδηγεί τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό με στόχο τη κυτταρική επιβίωση μέσω της επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση (5). Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον είναι στραμμένο στην μελέτη της υπομονάδας του HIF-1α γεγονός που συνέβαλε στην καλύτερη κατανόηση του τρόπου ρύθμισης και λειτουργίας της υπομονάδας αυτής (65).

Η ρύθμιση της λειτουργίας της υπομονάδας του HIF-1α γίνεται σε πολλαπλά επίπεδα. Μέχρι σήμερα έχει γίνει κατανοητό πως εκτός από το οξυγόνο η υπομονάδα του HIF-1α ρυθμίζεται σημαντικά σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης, μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (66). Εκτός από την οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α οι σημαντικότεροι τρόποι ρύθμισης του αφορούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες (27).

Πολύ διαδεδομένο τρόπο ρύθμισης του HIF-1α αποτελεί η φωσφορυλίωση που επηρεάζει την λειτουργικότητα της υπομονάδας του HIF-1α. Στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν ταυτοποιηθεί δύο διακριτές φωσφορυλίωσεις που διαμεσολαβούνται από την κινάση της καζεΐνης **CK1δ και τις ERK1/2**. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες 1/2 (ERK1/2) στις Ser641/643 αυξάνει τη δραστηριότητά του καθώς αυξάνει την πυρηνική συσσώρευση της υπομονάδας HIF-1α και επάγει την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη NPM1 (44). Η απουσία της φωσφορυλίωσης οδηγεί τον HIF-1α στη μιτοχόνδριακή μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη μορταλίνη, όπου σχηματίζεται ένα σύμπλοκο με αντιαποπτωτική λειτουργία (43). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση από την κινάση CK1δ στη Ser247 της επικράτειας PAS-B αναστέλλει τον ετεροδιμερισμό της με τον ARNT, χωρίς όμως να επηρεάζει τον πυρηνικό της εντοπισμό κάτι το οποίο διαπιστώθηκε μετά από πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες μορφές στη θέση φωσφορυλίωσης (53). Σε περιπτώσεις κατάργησης της θέσης φωσφορυλίωσης (S247A) η πυρηνική συσσώρευση ή τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α δεν επηρεάζονται, ωστόσο φαίνεται να επηρεάζεται θετικά ο ετεροδιμερισμός του με τον ARNT.

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορα Αρσένη Χριστίνα βρέθηκε πως η μεταλλαγμένη μορφή του HIF-1α S247D-S641/3A που σύμφωνα με τα προηγούμενα αποκλείεται από τον πυρήνα ενώ δεν αλληλεπιδρά με τον ARNT. Η διπλά μεταλλαγμένη αυτή μορφή είχε κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό και σε πειράματα κυτταρικής κλασμάτωσης συνεντοπίστηκε σε κλάσματα που αντιστοιχούν αδιάλυτα με τις συνήθεις μεθόδους κυτταρικά στοιχεία μαζί με την πρωτεΐνη τουμπουλίνη και την κινάση CK1δ. Έτσι, για να βρεθεί σε ποια υποκυτταρικά στοιχεία εντοπίζεται αυτή η μορφή – που μιμείται την φωσφορυλίωση από την CK1δ και αποκλείει την φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 – έγινε αρχικά φασματοσκοπία μάζας σε ανοσοκατακρημνίσματα αυτής της μορφής.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αρχικά αναλύθηκαν σε πλατφόρμες βιοπληροφορικής ανάλυσης τα δεδομένα από την φασματοσκοπία μάζας και στην συνέχεια

μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της αμινοτελικής περιοχής του HIF-1α με πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων. Επίσης με τη χρήση μεταλλαγμένων μορφών του τμήματος 1-347 του HIF-1α που καταργούν ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση από την κινάση CK1δ, μελετήθηκε ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στην ισχύ της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με πρωτεΐνες που σημετεύουν στη δημιουργία μικροσωληνίσκων. Έτσι βρέθηκε:

### **1. Από την ανάλυση με Φασματοσκοπία Μάζας και βιοπληροφορική ανάλυση.**

- Με τη χρήση του προγράμματος **Gencodis** βρέθηκαν οι **κυτταρικές διαδικασίες** στις οποίες συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη μορφή SDSA του HIF-1α με την πλειονότητα να αφορά την οργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης, του κυτταροσκελετού και των μικροσωληνίσκων καθώς και τις μεταβολικές διεργασίες της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης. Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι **μοριακές λειτουργίες** αυτών των πρωτεϊνών από τις οποίες οι περισσότερες συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και αλλά και με νουκλεϊκά οξέα. Επίσης, εντοπίστηκαν τα **μονοπάτια** στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες και είναι καίριας σημασίας για την εμφάνιση πολλών ασθενειών όπως η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson disease), διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα αλλά και μεταβολικές οδοί οι οποίες συμμετέχουν στην προώθηση της καρκινογένεσης.
- Χρήση του προγράμματος **String** μέσω του οποίου δημιουργήθηκαν δίκτυα συσχέτισης μεταξύ του HIF-1α και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη μορφή SDSA. Αυτές έδειξαν συσχέτιση με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες συγκρότησης μικροσωληνίσκων, κυτταροσκελετού, γλυκόλυσης αλλά και με πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων που είχαν εντοπιστεί σε προηγούμενες μελέτες (μορταλίνη, VDAC1) και δικαιολογούνται από την αδυναμία φωσφορυλίωσης της SDSA μορφής από τις ERK1/2 (43).
- Με τη χρήση του προγράμματος **Gepia** δείχθηκε η θετική συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1α με την έκφραση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά η SDSA μορφή του σε 5 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Ενώ σημειώνεται ότι η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών συσχετίζεται με μη ευνοϊκή πρόγνωση για την πορεία της νόσου

**2.Κλωνοποίηση των cDNA που κωδικοποιούν για την επικράτεια των μορφών του HIF-1α 1-347WT, 1-347 S247A και 1-347 S247D σε πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό τον βακτηριακό μετασχηματισμό και την υπερέκφραση των χιμαιρικών με GST πρωτεϊνικών τμημάτων της αμινοτελικής επικράτειας του HIF-1α τα οποία και λήφθηκαν σε καθαρή μορφή.**

**3.Απομόνωση εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων από κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa.**

Βασιζόμενοι σε αυτή τη μεθοδολογία (62) έγινε εφικτή η παρασκευή εκχυλισμάτων με διαλυτές πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων για *in vitro* πειράματα αλληλεπίδρασης (όπως δείχθηκε στην παρούσα εργασία). Παράλληλα, όμως, δείχθηκε ότι είναι εφικτό να επιτευχθεί η *in vitro* ανασύσταση μικροσωληνίσκων χρησιμοποιώντας τον φαρμακευτικό παράγοντα paclitaxel, αποτελώντας έτσι, ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διεκρίνιση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με στοιχεία των μικροσωληνίσκων και την ρύθμιση της.

**4. Πειράματα συγκατακρήμνισης** των καθαρών GST-HIF-1α 1-347 μορφών με εκχυλίσματα πρωτεϊνών μικροσωληνίσκων έδειξαν την ικανότητα της αμινοτελικής περιοχής να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι το μετάλλαγμα που μιμείται την φωσφορυλίωση από την CK1δ (S247D) παρουσιάζει την ισχυρότερη δέσμευση με την τουμπουλίνη.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη – σε συνδυασμό με παλαιότερες παρατηρήσεις – υποδεικνύει ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ όταν αυτός βρίσκεται στον πυρήνα εμποδίζει την αλληλεπίδραση του με τον ARNT(53). Όταν όμως ο HIF-1α βρίσκεται εκτός πυρήνα (ελλείψει της φωσφορυλίωσης του από τις ERK1/2) τότε έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με στοιχεία των μιτοχονδρίων αναστέλλοντας την απόπτωση (43), ενώ παράλληλη φωσφορυλίωση του από τη CK1δ ενισχύει την αλληλεπίδραση του με πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων σύμφωνα με την ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων και των πειραμάτων συγκατακρήμνισης.

Μελλοντικά, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν πειράματα ελέγχου επίδρασης της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την κινάση CK1δ στην ικανότητα συγκρότησης των μικροσωληνίσκων κατά την υποξία αλλά και τη σημασία της για την προώθηση του κυτταρικού κύκλου σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου καθώς η συγκρότηση μικροσωληνίσκων είναι καθοριστικής σημασίας για την διεργασία της μίτωσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thomas LW, Ashcroft M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(9):1759-77.
2. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells.* 2019;8(3).
3. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408.
4. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(12):5510-4.
5. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 2014;49(1):1-15.
6. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(9):4273-8.
7. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development.* 1997;11(1):72-82.
8. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(4):808-13.
9. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 1):C1172-80.
10. Dayan F, Roux D, Brahim-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cancer Res.* 2006;66(7):3688-98.
11. Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res.* 2006;66(11):5641-7.
12. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, et al. Multiple splice variants of the human HIF-3  $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11032-40.
13. Semenza GL, Rue EA, Iyer NV, Pang MG, Kearns WG. Assignment of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics.* 1996;34(3):437-9.
14. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2005;37(3):535-40.
15. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(14):7987-92.
16. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$  into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(2):235-40.
17. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by MAPK. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27620-7.
18. Li RL, He LY, Zhang Q, Liu J, Lu F, Duan HX, et al. HIF-1 $\alpha$  is a Potential Molecular Target for Herbal Medicine to Treat Diseases. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:4915-49.
19. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer.* 2003;3(10):721-32.
20. Nakazawa MS, Keith B, Simon MC. Oxygen availability and metabolic adaptations. *Nature reviews Cancer.* 2016;16(10):663-73.

21. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 14):3485-93.
22. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):378-89.
23. Pezzuto A, Carico E. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. *Curr Mol Med.* 2018;18(6):343-51.
24. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature reviews Cancer.* 2013;13(9):611-23.
25. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1469-80.
26. Burroughs SK, Kaluz S, Wang D, Wang K, Van Meir EG, Wang B. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future Med Chem.* 2013;5(5):553-72.
27. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, See V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
28. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J.* 2016;283(3):413-24.
29. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2 $\alpha$  Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1 $\alpha$ . *Cancer Res.* 2010;70(20):7820-9.
30. Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol.* 2017;56(4):503-15.
31. Zhang Z, Yao L, Yang J, Wang Z, Du G. PI3K/Akt and HIF1 signaling pathway in hypoxiaischemia (Review). *Molecular medicine reports.* 2018;18(4):3547-54.
32. Gkotinakou IM, Kechagia E, Pazaitou-Panayiotou K, Mylonis I, Liakos P, Tsakalof A. Calcitriol Suppresses HIF-1 and HIF-2 Transcriptional Activity by Reducing HIF-1/2 $\alpha$  Protein Levels via a VDR-Independent Mechanism. *Cells.* 2020;9(11).
33. Bielecka ZF, Czarnecka AM, Szczylik C. Genomic Analysis as the First Step toward Personalized Treatment in Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2014;4:194.
34. Chen S, Sang N. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells. *J Cell Biochem.* 2016;117(2):267-78.
35. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci.* 2008;33(11):526-34.
36. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ -degradative pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29936-44.
37. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 $\alpha$  and is required for O<sub>2</sub>-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Molecular cell.* 2007;25(2):207-17.
38. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes & development.* 2000;14(1):34-44.
39. Hetherington K, Hegedus Z, Edwards TA, Sessions RB, Nelson A, Wilson AJ. Stapled Peptides as HIF-1 $\alpha$ /p300 Inhibitors: Helicity Enhancement in the Bound State Increases Inhibitory Potency. *Chemistry.* 2020;26(34):7638-46.
40. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, Befani C, et al. MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1833(6):1378-87.
41. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature reviews Cancer.* 2008;8(1):51-6.
42. Cho S, Choi YJ, Kim JM, Jeong ST, Kim JH, Kim SH, et al. Binding and regulation of HIF-1 $\alpha$  by a subunit of the proteasome complex, PSMA7. *FEBS letters.* 2001;498(1):62-6.



43. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci.* 2017;130(2):466-79.
44. Koukoulas K, Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1alpha interaction with NPM1. *Mol Oncol.* 2021.
45. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 2002;111(5):709-20.
46. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends in molecular medicine.* 2003;9(4):160-8.
47. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS letters.* 2003;549(1-3):105-9.
48. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(1):394-400.
49. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *International journal of cancer.* 2005;117(5):764-74.
50. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:11.
51. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular signalling.* 2005;17(6):675-89.
52. Schitteck B, Sinnberg T. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2014;13:231.
53. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 17):2976-86.
54. Kourti M, Ikonoumou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cellular signalling.* 2015;27(6):1129-40.
55. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer.* 2014;120(22):3446-56.
56. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33095-106.
57. García-Moreno A, López-Domínguez R, Ramirez-Mena A, Pascual-Montano A, Aparicio-Puerta E, Hackenberg M, et al. 2021.
58. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research.* 2019;47(D1):D607-D13.
59. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research.* 2019;47(W1):W556-W60.
60. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry.* 1973;12(16):3055-63.
61. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature reviews Cancer.* 2010;10(3):194-204.
62. Sloboda RD. Isolation of microtubules and microtubule-associated proteins using Paclitaxel. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015(1):pdb prot081190.
63. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell.* 2014;25(18):2677-81.
64. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 1979;277(5698):665-7.

65. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007;80(2):51-60.
66. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018;109(3):560-71.
66. Ali Z. Investigating mechanisms of angiogenesis in health and disease using zebrafish models [Internet] [PhD dissertation]. [Linköping]: Linköping University Electronic Press; 2018. (Linköping University Medical Dissertations). Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:liu:diva-153266>